

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Papel del factor de transcripción ETS 1 y 2 sobre la liberación y funcionalidad de las células progenitoras endoteliales en arterias humanas. Modulación por fármacos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Úrsula Fabiola Medina Moreno

Directores

**Teresa Tejerina Sánchez
Fernando Reguillo**

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DPTO. FARMACOLOGÍA



**PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ETS 1 Y 2
SOBRE LA LIBERACIÓN Y FUNCIONALIDAD DE LAS
CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES EN
ARTERIAS HUMANAS.
MODULACIÓN POR FÁRMACOS**

TESIS DOCTORAL

ÚRSULA FABIOLA MEDINA MORENO

MADRID, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ETS 1 y 2 SOBRE LA LIBERACIÓN Y
FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES EN
ARTERIAS HUMANAS. MODULACIÓN POR FÁRMACOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR
ÚRSULA FABIOLA MEDINA MORENO**

MADRID, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ETS γ SOBRE LA LIBERACIÓN Y
FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES EN
ARTERIAS HUMANAS. MODULACIÓN POR : α FA57CG**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR
ÚRSULA FABIOLA MEDINA MORENO**

DIRECTORES
DRA. TERESA TEJERINA SANCHEZ
DR. FERNANDO REGUILLO

MADRID, 2015



TERESA TEJERINA SÁNCHEZ, CATEDRÁTICA DE FARMACOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ETS 1 Y 2 SOBRE LA LIBERACIÓN Y FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES EN ARTERIAS HUMANAS. MODULACIÓN POR FÁRMACOS” constituye un trabajo original de investigación, realizado bajo mi supervisión, en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Del mismo modo, se autoriza su presentación por parte de la candidata, Úrsula Fabiola Medina Moreno, para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas.

Teresa Tejerina Sánchez,



D. FERNANDO JOSÉ REGUILLO LACRUZ , DOCTOR EN MEDICINA, FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA DEL SERVICIO DE CIRUGÍA CARDIACA DEL HOSPITAL CLÍNICO DE MADRID, PROFESOR ASOCIADO DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UCM

CERTIFICA:

Que la tesis titulada “PAPEL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ETS 1 Y 2 SOBRE LA LIBERACIÓN Y FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES EN ARTERIAS HUMANAS. MODULACIÓN POR FÁRMACOS” realizada por URSULA MEDINA MORENO para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas, constituye un trabajo original de investigación, que ha sido realizado en parte bajo mi dirección en el Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico autorizo su presentación para que sea juzgado por el Tribunal correspondiente.

F. REGUILLO LACRUZ

A mi hija Sofía, gracias por confiar en mí, por la paciencia y tu amor incondicional a pesar de la distancia. Gracias por las sonrisas que iluminan mis días.

AGRADECIMIENTOS

Los que realmente me conocéis, sabrán de sobra que me es difícil expresar con palabras mis sentimientos. Pero ahora voy a tratar de hacerlo. Para ello, voy a ocupar un poema que habla del espíritu luchador que todos debemos tener sea cual sea nuestra profesión y que de alguna forma, tanto mis padres (Víctor y Rosalba), abuelos, profesores (Maite), hermanas (Dahiana y Sharim), amigos y mi pequeña niña (Sofía), me han enseñado a su modo y de una u otra forma, a lo largo del tiempo que hemos compartido juntos...

¡¡¡Gracias por todo!!!

Es indigno de un noble como tú dejarse atrapar por el desaliento en el momento de lucha. ¿Cómo es posible? Esto no te hará ganar ni el cielo ni la tierra. ¡No desfallezcas! Esto no es propio de alguien como tú. Sobreponete al desaliento y levántate como el fuego que quema todo lo que encuentra a su paso.

Lo irreal nunca ha existido; lo Real nunca ha dejado de existir. Con certeza, esta verdad sólo la han podido entender los auténticos buscadores de la verdad. El espíritu es indestructible e imperecedero; todo lo penetra. El espíritu nunca nace y nunca muere: es eterno. Nunca ha nacido, está más allá del tiempo; del que ha pasado y el que ha de venir. Así pues, ¡levántate, con tú ánimo listo para la lucha!

Permanece en paz, tanto en el placer como en el dolor; en la victoria, tanto como en la derrota; tanto si ganas como si pierdes. Prepárate para la guerra con tu alma tranquila. Escucha la sabiduría del conocimiento, camino de la libertad de ataduras y de lo eterno. En este camino, ningún esfuerzo es baldío, ni existe posibilidad de desgracia. Hasta el más mínimo progreso supone liberación de tus miedos.

El único pensamiento que debe ocupar la mente de quien anda este camino es la determinación. La mente de aquellos que no tienen

determinación desvaría en un aluvión de pensamientos perturbadores. Concentra tu mente en tu trabajo, pero nunca permitas que tu corazón se apegue a los resultados. Nunca trabajes por amor a la recompensa, y realiza tu trabajo con constancia y regularidad.

Realiza tu trabajo en la paz del conocimiento, lejos de todo deseo egoísta; desapegado del éxito, tanto como del fracaso. La paz del conocimiento es estable y permanente, pues trae equilibrio a tu mente. Una vez que hayas cruzado el profundo océano de las apariencias estarás aún más allá de lo que hay escrito en cualquier escritura; ya sea de tiempos pasados o los que han de venir.

Bhagavad Gita, poema hindú.

ABREVIATURAS

- DM: Diabetes mellitus
- ADA: Asociación Americana de Diabetes
- FDI: Federación Internacional de Diabetes
- SDF1/CXCL12: Factor 1 derivado de células estromales
- EPCs: Células progenitoras endoteliales
- ECV: Enfermedad cardiovascular
- DPP4: Dipeptidil peptidasa 4
- MMP9: Metaloproteinasa 9
- GLP1: Péptido 1 similar al glucagón
- ROS: Especies reactivas de oxígeno
- HIF1 α : Factor inducible por hipoxia 1
- G-CSF: Factor estimulante de colonias granulocíticas
- CE: Células endoteliales
- CEPC: Células progenitoras endoteliales circulantes
- vWF: Factor von Willebrand
- LDL: Lipoproteínas de baja densidad
- VEGFR2: Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular
- FGF: Factor de crecimiento fibroblástico
- IGF: Factor de crecimiento insulínico
- NO: Óxido nítrico
- IAM: Infarto agudo del miocardio
- HbA1c: Hemoglobina glucosilada tipo 1 c
- VSMC: Células de músculo liso vascular
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- ELISA: Ensayo por absorbancia mediante anticuerpos ligados a enzimas
- CFU: Unidades formadoras de colonias
- KDR: Receptor con dominio kinasa inserto
- SDF: Factor derivado del estroma

- PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
- TNF: Factor de necrosis tumoral
- tPA: Activador del plasminógeno tisular
- PAI: Inhibidor de activador del plasminógeno
- IP3: Trifosfato de inositol
- MAP: Proteína activada por mitógenos
- ERK: Kinasa de regulación extracelular
- COX-2: Ciclooxygenasa 2
- AGE: Elementos de glicación avanzada
- RAGE: Receptores de elementos de glicación avanzada
- MCP-1: Proteína quimio-atrayente de monocitos 1
- HDL: Lipoproteínas de alta densidad
- DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco
- FCS: Suero fetal bovino
- RPMI: Instituto de manufactura y prototipado rápido
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- PBS: Solución salina tamponada con fosfato
- NADH: Nicotin-adenín-dinucleótido hidrogenado
- TRIS: Trizma base
- HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-piperacina-etano-ácido sulfónico
- HBSS: Solución salina tamponada de Hank
- PVDF: fluoruro de polivinildeno
- TBS: Solución salina tamponada con trizma base
- ECL: Dispositivo de ampliación de quimioluminiscencia
- BSA: Albúmina de suero bovino
- IMC: Índice de masa corporal
- ANOVA: Análisis de la varianza
- DMSO: Dimetil-sulfóxido
- Dil-Ac-LDL: Receptor acetilado de LDL
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

Resumen

Papel del factor de transcripción Ets (1 y 2) sobre la liberación y funcionalidad de las células progenitoras en endoteliales en arterias humanas. Modulación por fármacos

Introducción: La enfermedad cardiovascular sigue siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial en países desarrollados, fundamentalmente en pacientes con DM tipo 2, en algunas poblaciones puede representar el 50% o más de las muertes por diabetes (Joseph and Golden, 2014). Esto se debe en gran medida a factores ya conocidos como la predisposición genética, la aterogénesis acelerada, la inflamación crónica, la isquemia silenciosa y la presencia de patologías co-existentes como la hipertensión o la dislipidemia. La diabetes es sin duda alguna, uno de los problemas de salud más graves del siglo XXI y actualmente en España, la prevalencia nacional es de 10,83% (FDI 2013).

Las células progenitoras endoteliales juegan un papel clave en los procesos de reparación endotelial. En los pacientes con DM tipo 2 y enfermedad cardiovascular, se sabe que la funcionalidad de las EPCs es deficiente, aunque el mecanismo exacto de disfunción aún es incierto. Además, está bien descrito que en la evolución natural de los pacientes con DM tipo 2 presentan un mayor número de complicaciones y con mayor frecuencia estos pacientes estarán abocados a procedimientos de revascularización. Múltiples estudios (Sidhu and Boden, 2015; Verma et al., 2013) que han señalado la importancia de una adecuada terapia de reparación endotelial (terapia con EPCs), que ayudaría a disminuir las alteraciones en los procesos de reendotelización en los pacientes con DM tipo 2 y enfermedad cardiovascular, y por consiguiente disminuiría la aparición de la enfermedad cardiovascular (ECV).

En los últimos años el eje SDF1 y su co-receptor CXCR4 se han convertido en un elemento clave en el estudio de la enfermedad cardiovascular

(Doring et al., 2014). Además, se ha hipotetizado que los factores de transcripción, miembros de la familia E26 (ETS), participan de forma activa en la evolución de la patología cardiovascular y, en los pacientes con DM tipo 2, la alteración específica del factor de transcripción Ets-2, podría contribuir a la disfunción de las EPCs (Dejana et al., 2007; Seeger et al., 2009).

Con estos datos en mente, nuestro principal objetivo fue determinar si el grado de expresión de Ets-2-SDF1 α /CXCR4 es capaz de predecir la liberación de células progenitoras endoteliales circulantes (EPCs), así como determinar la funcionalidad de las EPCs y su medio condicionado (expresión de SDF1/CXCR4, formación de colonias, adhesión en flujo, y diferenciación vascular) mediante su estudio en cultivo después de inhibir Ets-2 y del estudio de la adhesión y del efecto sobre la reactividad vascular de estas células en las arterias de pacientes con enfermedad cardiovascular (ECV). Determinar si existe alteración de la expresión de SDF1/CXCR4 y Ets2, en pacientes con DM tipo 2. Relacionar los datos encontrados con los parámetros clínicos y de laboratorio de los pacientes sometidos a cirugía. Así como estudiar su modulación por fármacos inhibidores de DPP4 (Sitagliptina).

Material y Métodos: Se estudiaron 90 pacientes sometidos a cirugía de revascularización miocárdica, se dividieron por grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos. Se terminó la expresión de SDF1/CXCR4, Ets-2 y moléculas implicadas en los procesos de reparación endotelial en EPCs circulantes de sangre periférica; así como el efecto de Sitagliptina en EPCs en cultivo. El efecto se verificó por Wester-blot y ELISA. El efecto sobre la reactividad vascular de las EPCs en arterias humanas, se determinó en un modelo “ex vivo” de adhesión por flujo, y el efecto en la expresión del eje SDF1/CXCR4 se verificó por inmunofluorescencia.

Resultados: Se observó una mayor frecuencia de patología cardiovascular en edades tempranas tanto en pacientes diabéticos como no diabéticos. Destaca una mayor prevalencia de dislipidemia en el grupo de pacientes diabéticos y mayor prevalencia de enfermedad cardiovascular en

mujeres diabéticas revascularizadas en comparación con no diabéticas. En los pacientes con DM tipo 2 la respuesta de liberación de EPCs determinada por los niveles de SDF1 α tiene un efecto tardío debido a los elevados niveles de glucosa y bajos niveles de HDL, pero este efecto disminuye en pacientes tratados con insulina. Se observó una baja expresión en el eje SDF1/CXCR4, asociado a bajos niveles de expresión de Ets-2, principalmente en los pacientes con DM tipo 2. Sin embargo, se observó un aumento en la expresión del factor de transcripción Ets-2, en pacientes con hiperlipidemia, asociándose con etapas tempranas de inestabilidad cardiovascular. La Sitagliptina en EPCs en cultivo, mejora la morfología celular y aumenta la expresión de SDF-1 α y su co-receptor CXCR4, a las 24 horas con la concentración de 1 μ M y este efecto no depende del estímulo por cuerpos apoptóticos vía Ets-2. Al inhibir la expresión de Ets-2 en cultivos, observamos una disminución en la expresión de Endoglin, marcador implicado en los procesos inflamatorios de la enfermedad cardiovascular; no se observaron cambios en la expresión de CXCR4. Al evaluar el efecto de las EPCs en arterias humanas desendotelizadas, observamos un efecto positivo en la relajación, asociado a la activación de CXCR4, ya que la expresión que se observó, aumenta en las arterias estudiadas.

Conclusiones: En los pacientes con DM tipo 2, debido a la isquemia silente y crónica, la respuesta de liberación de EPCs por efecto del eje SDF1 α y su co-receptor CXCR4, tiene un efecto tardío en los procesos de reparación endotelial, asociado a la fluctuación en los niveles de glucosa y bajos niveles de HDL. La funcionalidad deficiente de las EPCs circulantes, se asocia con la disminución de la expresión del factor de transcripción Ets-2 en estadios avanzados de la enfermedad cardiovascular en pacientes con DM tipo 2. Ets-2 podría ser un marcador temprano de inestabilidad cardiovascular asociado a estados de hiperlipidemia. La terapia con células progenitoras endoteliales en arterias humanas desendotelizadas, tienen un efecto positivo en la relajación, cuyo mecanismo propuesto depende de la activación de CXCR4, el cual permitiría la entrada de calcio, aumentando de forma

inmediata la liberación de NO. La terapia con Sitagliptina en las EPCs en cultivo, ayudaría revertir la funcionalidad deficiente de las EPCs, sobre todo en pacientes con DM tipo 2.

Summary

Role of transcription factors Ets (1 and 2) on the release and functionality of EPCs in human arteries. Modulation by drugs.

Aim: Cardiovascular disease (CVD) remains the leading cause of morbidity and mortality in developed countries, specially in patients with Diabetes Mellitus (DM) type 2 (Joseph and Golden, 2014), a disease with a prevalence of 10.83% in Spain (FDI 2013). This is due to factors such as genetic predisposition, accelerated atherogenesis, chronic inflammation, silent ischemia and the presence of coexistent pathologies including hypertension or dyslipidemia.

Endothelial progenitor cells (EPCs) play a key role in endothelial repair processes. In patients with concomitant DM type 2 and CVD it is known that the functionality of EPCs is poor, although the exact mechanism of dysfunction is still uncertain. In addition, a higher number of complications have been described in the natural evolution of patients with DM type 2, who are often doomed to revascularization procedures. Several studies (Sidhu and Boden, 2015; Verma et al., 2013) have pointed out the importance of an adequate therapy based on endothelial repair using EPCs, which could help reduce alterations in the re-endothelialization process, therefore decreasing the occurrence of CVD.

In recent years the SDF-1 axis and the CXCR4 co-receptor have become key elements in the study of CVD (Doring et al., 2014). It has been hypothesized that transcription factors of the E26 family, which actively involved in the development of CVD in patients with DM type 2, and more specifically alterations of the Ets-2 transcription factor could contribute to dysfunction of the EPCs (Dejana et al., 2007; Seeger et al., 2009).

Our main aims are: 1) to determine whether the degree of expression of Ets-2-SDF1 α /CXCR4 is capable of predicting the release of circulating EPCs; 2) to determine the functionality of isolated EPCs and their conditioned medium (expression of CXCR4/SDF1, formation of colonies,

flow adhesion, and vascular differentiation) *in vitro* after inhibiting Ets-2 as well as by the study of the adhesion and effects of these cells on vascular reactivity in arterial portions obtained from patients CVD; 3) To determine the effect of altered expression levels of CXCR4/SDF1 and Ets2 in patients with DM type 2, relating our experimental data with clinical parameters from patients undergoing surgery, as well as to study their modulation by DPP4 inhibitor drugs (Sitagliptin).

Methodology: 90 patients showing angiographically demonstrated coronary artery disease who underwent coronary artery-bypass grafting were divided as diabetic and non-diabetic and recruited for the study. Peripheral mononuclear cells were obtained by Ficcoll-Hypaque density gradient centrifugation. Expression of Ets-2, CXCR4, and SDF1 were measured by Western blot. The effect of Sitagliptin in cultured EPCs was measured by Western blot and ELISA. The effect of EPCs in the vascular reactivity in human arteries was determined *ex vivo* in a flow chamber model, and the effect on the expression of SDF1/ CXCR4 was verified by immunofluorescence.

Results: an increased frequency of CVD was observed at early ages in both diabetic and non-diabetic patients. A higher prevalence of dyslipidemia was observed in diabetic patients, as well as a higher prevalence of CVD in women with diabetes compared with non-diabetic. In patients with DM type 2 the release of EPCs, as determined by levels of SDF1 α , has a delayed effect due to the high levels of glucose and low levels of HDL, but this effect decreases in patients treated with insulin. Compared to non-diabetic patients, DM type 2 patients showed lower expression of components of the SDF1/CXCR4 axis (Non DM type 2: $3,2 \pm 2,3$ vs DM type 2: $1,41 \pm 1,4$; Non DM type 2: $1,32 \pm 1$ vs DM type 2: $1,08 \pm 0,9$), which is associated with low levels of expression of Ets-2 (Non DM type 2: $1,6 \pm 1,5$ vs DM type 2: $1,17 \pm 1$). However, an increase in the expression of the transcription factor Ets-2 was observed in patients without cardiovascular risk factor ($2,122 \pm 1,485$), associated with early stages of cardiovascular instability, and a decrease in the expression was observed in patients with longer evolution of CVD. The addition of

Sitagliptin in cultured EPCs improved cell morphology and increased the expression of SDF-1 α and the CXCR4 co-receptor at 24 hours, an effect that was independent of stimulus by apoptotic bodies. The Ets-2 siRNA decreased the expression of endoglin, a marker involved in inflammatory processes of CVD; there were no changes in the expression of CXCR4. Regarding the actions of EPCs in human arteries without endothelium, we observed a positive effect in the relaxation of human arteries after exposure to EPCs in flow, associated with the activation of CXCR4.

Conclusions: In patients with DM type 2 the response to EPCs release as a result SDF1 α axis and CXCR4 co-receptor, has a late effect on endothelial repair processes associated with fluctuating glucose levels and low levels HDL. Poor functionality of circulating EPCs is associated with decreased expression of the transcription factor Ets-2 in advanced stages of CVD in patients with DM type 2, indicating that Ets-2 could be an early marker of cardiovascular instability associated with states of hyperlipidemia. In human arteries without endothelium, EPCs therapy has a positive effect on relaxation, which proposed mechanism depends on the activation of CXCR4 that could itself allow calcium entry, immediately increasing the release of NO. Therapy with Sitagliptin on EPCs in culture would help reverse the poor functionality of the EPCs, especially in patients with DM type 2.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
I. INTRODUCCIÓN.....	4
1. Diabetes Mellitus y la Enfermedad Cardiovascular.	5
1.1. Alteraciones en las EPCs en la DM.	8
2. Células Progenitoras Endoteliales (EPCs)	9
2.1. Las EPCs en los procesos de reparación endotelial	14
2.2 Función de las EPCs.	17
3. Eje SDF1/CXCR4.....	20
4. Factor de transcripción endotelial Ets-2.....	22
5. Incretinas: Inhibidores de dipeptidil peptidasa.	24
JUSTIFICACIÓN	27
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	29
1. Hipótesis	30
2. Objetivos.....	30
III. MATERIAL Y MÉTODOS	32
1.- Pacientes	33
1.1 Diseño del estudio clínico	33
1.2 Criterios de selección de los pacientes	33
1.3 Procedimiento de recolección de datos.....	34
1.3.1. Variables socio-demográficas.....	34
1.3.2. Variables bioquímicas.....	34
1.3.3. Variables de seguimiento postoperatorio	34
2. Modelos de estudio para la evaluación de las moléculas de adhesión	35
2.1. Moléculas de adhesión en Pacientes	35
2.1.1. Obtención de células progenitoras endoteliales (EPCs) en sangre periférica	35
2.1.2. Separación de sangre en gradiente de densidad	35
2.1.3. Extracción de proteínas	36
2.1.4. Técnica de Western- Blot.....	37
2.1.5. Determinación de SDF-1 α en plasma	38
2.2. Moléculas de adhesión en cultivos de células progenitoras endoteliales.	38
2.2.1. Aislamiento y cultivo de células progenitoras endoteliales humanas	38
2.2.2 Efecto de los inhibidores de DPP4 en cultivos de células progenitoras endoteliales.....	39

3. Métodos de adhesión de las células progenitoras endoteliales y su funcionalidad en arterias humanas desendotelizadas	39
3.1. Estudio histomorfométrico.....	39
3.2 Estudio inmunohistoquímico. Expresión del eje SDF1/CXCR4, en las arterias de los pacientes revascularizados diabéticos y no diabéticos y/o ateroscleróticos.....	40
3.2.1. Localización intracelular de proteínas por microscopía confocal	40
3.3 Modelo “ex vivo” de reactividad vascular	42
3.3.1 Arterias mesentéricas	42
3.3.2. Protocolo de experimentación.....	43
4. Estudio del factor de transcripción Ets-2.....	46
4.1 Inhibición mediante siRNA.....	46
4.2. Evaluación del medio condicionado en cultivo.....	47
5. Descripción operacional de las variables	48
5.1. Variable Dependiente.....	48
5.2. Variables independientes	48
.....	50
6. Aspectos estadísticos.....	50
7. Aspectos Éticos	51
8. Financiación	51
IV. RESULTADOS.....	52
Análisis descriptivo de los pacientes estudiados	53
4. Funcionalidad y papel de las moléculas de adhesión en pacientes ateroscleróticos diabéticos y no diabéticos sometidos a revascularización miocárdica.....	58
4 .1 Niveles de SDF1 α en plasma.....	58
4.2 Alteraciones en la expresión del eje SDF1/CXCR4 en las EPCs y su relación con parámetros clínicos.	61
4.3 Efecto de los inhibidores de DPP4 en cultivos de células progenitoras endoteliales.....	66
4.3.1 Efecto proliferativo (UFC).....	66
4.3.2 Efecto en la expresión de SDF1	69
4.3.3 Efecto en la expresión de CXCR4.....	71
4.3.5 Efecto en la expresión de SDF1 α	73
4.4. Estudio de adhesión de las células progenitoras endoteliales y su funcionalidad en arterias humanas desendotelizadas	75
4.4.1. Estudio histomorfométrico	75

4.4.2 Estudio inmunohistoquímico. Expresión del eje SDF1/CXCR4, en las arterias de los pacientes revascularizados diabéticos y no diabéticos y/o ateroscleróticos.....	76
4.4.3 Efecto sobre la reactividad vascular, de las células progenitoras endoteliales en arterias humanas, en un modelo “ex vivo” de adhesión por flujo	81
4.4.4 Efecto en la expresión del eje SDF1/CXCR4, de las células progenitoras endoteliales en arterias humanas, sometidas a la adhesión por flujo en un modelo “ex vivo” de reactividad vascular	85
4.5. Papel del factor de transcripción Ets-2 y su relación con moléculas de adhesión y regulación endotelial.....	87
4.5.1. Expresión del factor de transcripción Ets-2.....	87
4.5.2. Efecto de la inhibición del factor de transcripción Ets-2, en la funcionalidad de las EPCs en cultivo	92
V. DISCUSIÓN.....	97
VI. CONCLUSIONES	115
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	117

I. INTRODUCCIÓN

1. Diabetes Mellitus y la Enfermedad Cardiovascular.

En las últimas décadas, se ha observado un aumento sin precedentes en la prevalencia de diabetes mellitus (DM). La DM tipo 2 es una enfermedad crónica caracterizada por hiperglucemia, resultado de una carencia en la producción de insulina o una ineficiencia en su utilización (ADA, 2010). Según los últimos informes, se espera que para el año 2035 el incremento de la DM tipo 2 sea de 382 millones a 592 millones (Figura 1).

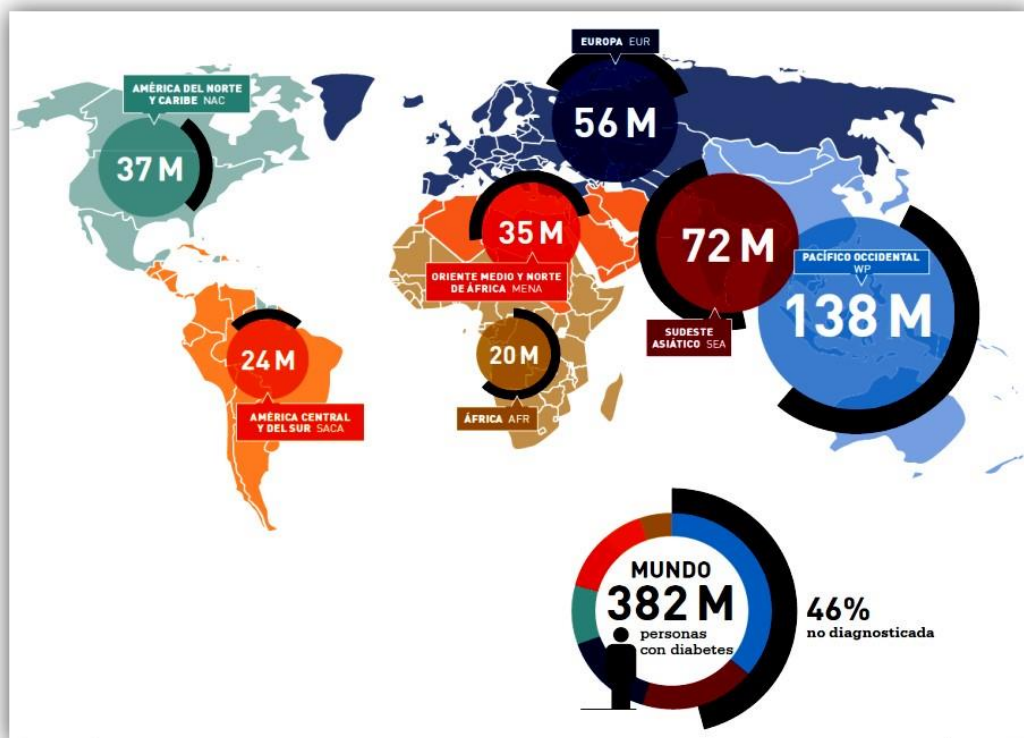


Figura 1. Número de personas con diabetes mellitus por región de la Federación Internacional de Diabetes (FID). Atlas de Diabetes de la FID 2013

Uno de los datos más alarmantes es la aparición temprana de DM tipo 2 en niños, adolescentes y adultos jóvenes, ya que debido a esto, se prevé que entre 2010 y 2030, el número de adultos con diabetes aumente un 20% en países desarrollados, pero el aumento será mayor en países en vías de desarrollo (69%) (Taskinen y Boren, 2015; Zimmet et al., 2014). Esto se debe en gran parte a la mayor incidencia de la enfermedad por una tendencia global al envejecimiento, al sobrepeso y a la inactividad física (Wang et al., 2006).

Inicialmente se planteó, que la inflamación crónica observada en pacientes con DM tipo 2, acompañada de la secreción de factores de crecimiento y citoquinas, podrían estar involucradas en el origen y desarrollo de complicaciones de la diabetes y la enfermedad cardiovascular (Ahmad et al., 2005).

La enfermedad cardiovascular está considerada como la primera causa de muerte e incapacidad en el mundo desarrollado, y se ha observado que en los pacientes con DM tipo 2, la mortalidad esta incrementada (Joseph y Golden, 2014), debido precisamente, a una mayor incidencia de complicaciones micro y macrovasculares.

Actualmente se sabe, que las complicaciones en la DM tipo 2, son el resultado de la interacción entre los cambios metabólicos sistémicos, como la hiperglucemia, la respuesta a metabolitos tóxicos por el tejido local dañado y a factores de riesgo no modificables (edad, género, genética, hiperglucemia gestacional) y modificables (hipertensión, dislipidemia, obesidad, tabaquismo) (Kitada et al., 2010). El papel de los factores de riesgo no modificables, sigue siendo ampliamente estudiado, pero actualmente los estudios se han enfocado en la identificación de mecanismos epigenéticos. A pesar de los esfuerzos en intervenciones sobre los factores de riesgo modificables, la prevalencia de los mismos no sólo permanece alta sino que está aumentando (Sarwar et al., 2010).

Es importante destacar, que la asociación observada entre la DM tipo 2 y un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, es debido al desarrollo precoz de la aterosclerosis, consecuencia de una combinación de disfunción endotelial y la aparición temprana de ateroma, los cuales disminuirían el papel anti-aterogénico del endotelio vascular. Estas alteraciones, preceden al desarrollo de la hiperglucemia manifiesta y por lo tanto, se deben considerar como un objetivo temprano crítico para la prevención de la aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular.

La aterosclerosis es una enfermedad vascular caracterizada por disfunción endotelial, aumento de la actividad inflamatoria y depósito de lipoproteínas aterogénicas. Una de las consecuencias de la aterosclerosis es la disfunción

de citoquinas endoteliales y moléculas de adhesión. Recientemente Weber y cols. han sugerido, que además del papel fundamental del eje CXCL12 (SDF-1) y su receptor CXCR4 en la movilización de las EPCs, ambos podrían alterar la aterogénesis nativa a través de la modificación de las funciones celulares en la aparición de la aterosclerosis (Weber et al., 2015). El factor de transcripción Ets-2 también tiene un papel primordial en la regulación de la homeostasis, el desarrollo vascular y la angiogénesis, y se ha postulado que podría mediar la activación del endotelio en el desarrollo de la aterosclerosis, promoviendo la inestabilidad de la placa (Cheng et al., 2011). Por otra parte las células progenitoras endoteliales (EPCs), desempeñan un papel fundamental en la reparación y mantenimiento endotelial y la angionénesis, a través de su diferenciación a células endoteliales maduras (Zampetaki et al., 2008). Las funciones de las EPCs reguladas por el eje SDF1/CXCR4 y el factor de transcripción Ets-2 en la enfermedad cardiovascular (ECV), parecen estar mal regulados (Fadini et al., 2009, Asahara et al., 2011).

En la DM tipo 2 la disfunción de las células endoteliales impedirá que se lleve a cabo una adecuada re-endotelización (Yang et al., 2010, Yao et al., 2009), ya que alterará la actividad migratoria de la células endoteliales. Así mismo, la hiperglucemia se ha asociado con una reducción y disfunción de las EPCs, alteración que se considera fundamental en la inducción de la enfermedad vascular y la aterosclerótica (Avogaro et al., 2011; Menegazzo et al., 2012). En base en estos hallazgos en el campo cardiovascular se está llevando a cabo una intensa investigación para idear nuevas estrategias que estimulen la reparación vascular mediada por EPCs.

Estudios recientes han demostrado que, la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) es una ecto peptidasa que escinde un dipéptido en la región N-terminal de varias proteínas, y se expresa en las células endoteliales. El DPP-4, parece modular la función de la médula ósea, así como participar en la regulación de la cinética de las EPCs (Desouza, 2013; Fadini y Avogaro, 2013). Además, se ha sugerido que los inhibidores de DPP4 regulan el tono vascular por el sistema de óxido nítrico, a través de un mecanismo de acción GLP1

independiente (Shah et al., 2011). Sin embargo, un claro efecto de DDP4 en las funciones de las EPCs no se ha demostrado.

1.1. Alteraciones en las EPCs en la DM.

Se ha postulado que la disfunción endotelial ocasionada por la alteración vascular en la Diabetes Mellitus podría deberse a un estado de inflamación subclínica, el cual podría estar dañando crónicamente las células endoteliales antes de que el paciente desarrolle la diabetes manifiesta (Menegazzo et al., 2012).

El número reducido y la disfunción (migración, proliferación y adhesión) de las EPCs en la DM se ha tratado de esclarecer en los últimos años, ya que se considera un mecanismo fundamental para inducir la enfermedad vascular y la aterosclerosis (Avogaro et al., 2011, Menegazzo et al., 2012). Inicialmente se postularon mecanismos bioquímicos como la hiperglucemia (Potenza et al., 2009) y la resistencia a la insulina, los cuales podrían inducir estados de inflamación, estrés oxidativo y supresión de NO; a la vez se describió que la dislipidemia primaria o secundaria concomitante también podría participar en la disfunción endotelial.

Actualmente, diversos modelos de estudio in vitro o en animales, han demostrado que las alteraciones en el número de EPCs, su diferenciación o funcionalidad, podrían ser ocasionados por diversos mecanismos o alteraciones en la vías de señalización (citocinas) como: a) alteraciones en el nicho celular en la MO; b) procesos crónicos de inflamación; c) elevados niveles de glucosa (\uparrow apoptosis, \downarrow MMP9); d) deficiencia de HIF1 α por ROS; e) disminución de la expresión y actividad de eNOS (\downarrow de NO sistémico); f) \uparrow de los niveles de SDF1 α en MO (\uparrow de la actividad de DPP4 y \downarrow de SDF1 α en tejidos isquémicos) y disminución del G-CSF. En base a estos datos, se están buscando estrategias que puedan disminuir las alteraciones ocasionadas por la DM en las EPCs, así como estrategias que traten de estimular la reparación endotelial mediada por las EPCs con el consiguiente beneficio en la disminución de accidentes y complicaciones vasculares y/o dislipidemia aterosclerótica (Fadini, 2014; Yiu y Tse, 2014).

2. Células Progenitoras Endoteliales (EPCs)

Desde su descubrimiento hace casi dos décadas, las células progenitoras endoteliales (EPC), han sido objeto de múltiples e intensas investigaciones. Los primeros informes que señalan la presencia de células endoteliales (CE) datan de 1930. Primero se sugirió su existencia, al encontrar formaciones “de aspecto capilar” en cultivos de leucocitos (Hueper, 1932). Posteriormente, se describió el crecimiento de “procesos tubulares organizados” en cultivos de células sanguíneas, a las cuales se agregaba el plasma de las mismas (Parker, 1933). En 1963, se observaron conglomerados de células endoteliales en los centros de las prótesis vasculares, mencionando que se podrían formar de células circulantes sanguíneas y no de la formación de capilares a partir del revestimiento por el endotelio (Stump et al., 1963).

Así, se estimuló el interés por el endotelio en los procesos vasculares y se desarrollaron métodos de investigación para tratar de replicar el papel del endotelio y de las células sanguíneas con las que interactuaba. Diez años más tarde, Schlingemann y cols. encontraron un “subconjunto de células de morfología similar a células que migran” en cultivos endoteliales de vena umbilical humana, las cuales expresaban el marcador CD34, este subconjunto de células fue ligado activamente a los procesos de angiogénesis (Schlingemann et al., 1990). En 1991, se postuló que las células endoteliales, podrían ser un marcador apropiado de la lesión del vaso. George y cols., lograron aislar e identificar las células endoteliales humanas directamente en la sangre circulante por medio de un anticuerpo monoclonal específico de células endoteliales, el S-Endo1 (George et al., 1992). Además, demostraron un aumento significativo del número de células endoteliales en muestras sanguíneas de pacientes sometidos a cateterismo cardíaco.

Posteriormente, estudios como los de Augustin y cols. evidenciaron nuevamente el papel crucial de la monocapa celular interna que recubría los vasos, tanto en estados fisiológicos como patológicos (Augustin et al., 1994). Scott y cols. describieron un posible papel de las EPCs como reguladoras del

tráfico de células circulantes (originadas a partir de células madre) a través de citoquinas asociadas, pero que competían por su “transdiferenciación” (Scott et al., 1994).

En 1997, se aislaron e identificaron las “células progenitoras endoteliales” (EPC) circulantes en sangre periférica de animales adultos, las cuales se adherían y “parcheaban” las zonas de lesión endotelial (Asahara et al., 1997). Posteriormente, en 1998 se introdujo un nuevo termino, “células progenitoras endoteliales circulantes” (CEPC), las cuales podrían derivar de la médula ósea (MO) y se movilizaban a la circulación periférica. Estas células se identificaron como células que expresaban los marcadores CD34 (+), el factor von Willebrand (vWF), y lipoproteínas de baja densidad acetiladas (a-LDL) y se trasplantaron en un modelo in vivo. Posteriormente se colocó un injerto en la aorta torácica descendente y observaron la colonización de la superficie del injerto con células de morfología endotelial (Shi et al., 1998), confirmando el fenómeno propuesto en 1963 por Stump que sugería la presencia de hemangioblastos circulantes en el adulto.

Con estos hallazgos, se cuestionaba el paradigma convencional de las células precursoras hematopoyéticas, y se aceptaba que el proceso de reparación endotelial se podría llevar a cabo de dos maneras no excluyentes:

- Angiogénesis, por proliferación y migración de las células vecinas, de una forma local (Folkman et al., 1971).
- Vasculogénesis, por células precursoras circulantes en la sangre, y cuyo origen es la médula ósea (Asahara et al., 1999).

Uno de los problemas fundamentales que surgieron en el proceso de identificación de las EPCs, fue el poder caracterizarlas y establecer su papel en la biología vascular. De acuerdo con los estudios iniciales, las EPCs y CEPCs, se definían como células positivas tanto para el marcador de células madre hematopoyéticas (CD34+) como para el receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR2). Este último propuesto por Ziegler y cols., como un marcador funcional para definir a las células madre de las células progenitoras (Nowak et al., 2004; Ziegler et al., 1999).

Peichev y cols., mostraron que las células CD34⁺ circulantes que expresan VEGFR-2⁺ y AC133⁺ constituyen una población fenotípicamente y funcionalmente distinta de células endoteliales maduras (Peichev et al., 2000). A raíz de estos resultados, se utilizó al marcador AC133 (CD133) en la clasificación de las EPCs, ya que se consideraba como un marcador eficaz para distinguir las verdaderas EPCs y CEPCs de células de origen mielomonocítico (Rehman et al., 2003), este marcador, CD133, se pierde de forma gradual, como un posible reflejo de la transformación de las EPCs circulantes en células endoteliales maduras (CECs).

Posteriormente, se especuló sobre la existencia de una estrecha relación entre monocitos y células de estirpe endotelial, sugiriendo una célula progenitora común localizada en médula ósea llamada hemangioblasto. Muchas de estas células poseen marcadores monocíticos y mieloides, y realizan la mayor parte de su función mediante la secreción de citoquinas para el apoyo de las células endoteliales residentes, por lo que se han llamado células “angiogénicas circulantes” (Schmeisser et al., 2001; Zhao et al., 2003). Dada la íntima implicación entre estas células y subpoblaciones de monocitos, se ha supuesto un puente entre la teoría hemática e inmunológica de la aterosclerosis (Ribatti et al., 2002).

De esta forma, se trató de aislar y caracterizar a las EPCs y CEPCs en un gran número de estudios (Bussolati et al., 2005; Hristov and Weber, 2004; Iwami et al., 2004; Porat et al., 2006; Rustemeyer et al., 2007), cada uno de los cuales proponía diversos métodos de cultivo y detección mediante diferentes combinaciones de antígenos de superficie. Se consideró que al ser aisladas a partir de células mononucleares de MO y sangre periférica, las EPCs podrían provenir de cuatro vertientes: 1) células madre hematopoyéticas (número pequeño), 2) células mieloides (diferenciadas en cultivo), 3) células progenitoras circulantes y 4) células circulantes endoteliales maduras (desprendidas de la pared del vaso) (Urbich and Dimmeler, 2004). Y dado que las EPCs, CEPs y CECs, expresaban marcadores endoteliales de superficie muy similares (VEGFR2, Tie-2, VE.cadherin, CD34, CD146 y E-selectin, se trató de estandarizar los marcadores y los ensayos in vitro para distinguirlas (Figura 2).

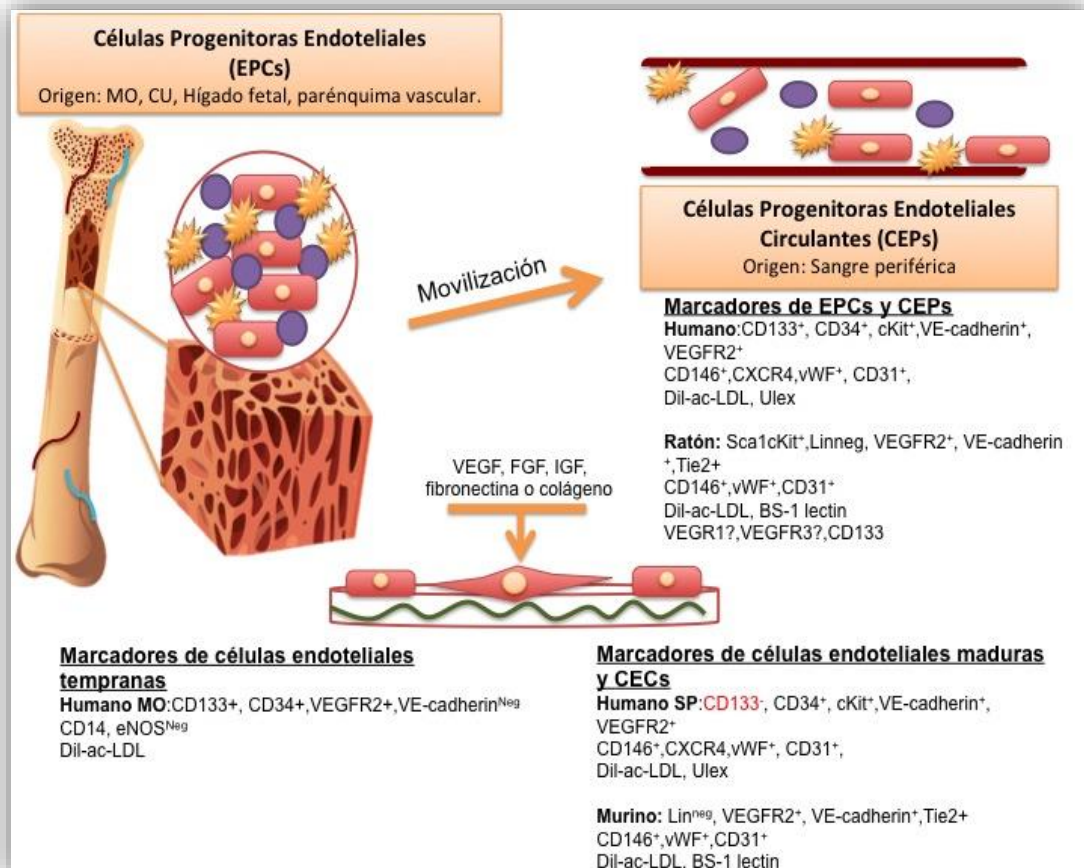


Figura 2. Marcadores reconocidos y expresados en las EPCs, CEPs y CECs. Modificada de (Rafii y Lyden 2003). EPCs: células progenitoras endoteliales. CEPs: células progenitoras endoteliales circulantes. CECs: células endoteliales maduras circulantes.

En el ensayo de formación de colonias basado en la cinética de crecimiento in vitro, se incubaban las células aisladas con VEGF, FGF, IGF y fibronectina o colágeno, dando lugar a dos tipos de colonias: a) tempranas (9 días de crecimiento y bajo potencial proliferativo), las cuales se derivan de las CEC de la pared el vaso receptor y b) tardías (20 días de crecimiento y con alto potencial proliferativo), las cuales se originan principalmente de las EPCs-derivadas de MO y de las CEPs.

Así, se postulaba que, las EPCS derivadas de MO eran de origen hematopoyético y posiblemente derivaban del hemangioblasto (Rafii and Lyden, 2003), pero una vez aisladas, expresaban marcadores tempranos cuyo fenotipo era CD133+/CD34+/VEGFR2+/VE-cadherin-; en contraste con las EPCS aisladas de sangre periférica, las cuales perdían CD133 y gradualmente se diferenciaban en células endoteliales maduras. Además, ponían de realce que las EPCs tempranas en cultivo (7 días), expresaban altos niveles del marcador monocítico CD14, pero no expresaban NO-sintasa endotelial (Swerdlow et al.) ni VE-cadherin y no eran capaces de generar el crecimiento posterior de células endoteliales (Hristov and Weber, 2004; Iwami et al., 2004)

En 2005, utilizando el ensayo proliferativo de EPCs individuales, se describieron tres poblaciones celulares con potencial angiogénico: 1) EPC hematopoyéticas, con expresión de antígenos endoteliales y hematopoyéticos, pero con limitado potencial proliferativo; 2) CECs, que expresan antígenos endoteliales, pero no hematopoyéticos, y bajo potencial proliferativo; y 3) los EOCs, que expresan exclusivamente antígenos específicos de células endoteliales y tienen un gran potencial proliferativo (Ingram et al., 2005).

En la actualidad una de las revisiones más completas para la evaluación de los fenotipos e identificación de las EPCs es el propuesto por Fadini y cols. (Figura 3), el cual se basa en los siguientes protocolos (Fadini et al., 2012b).

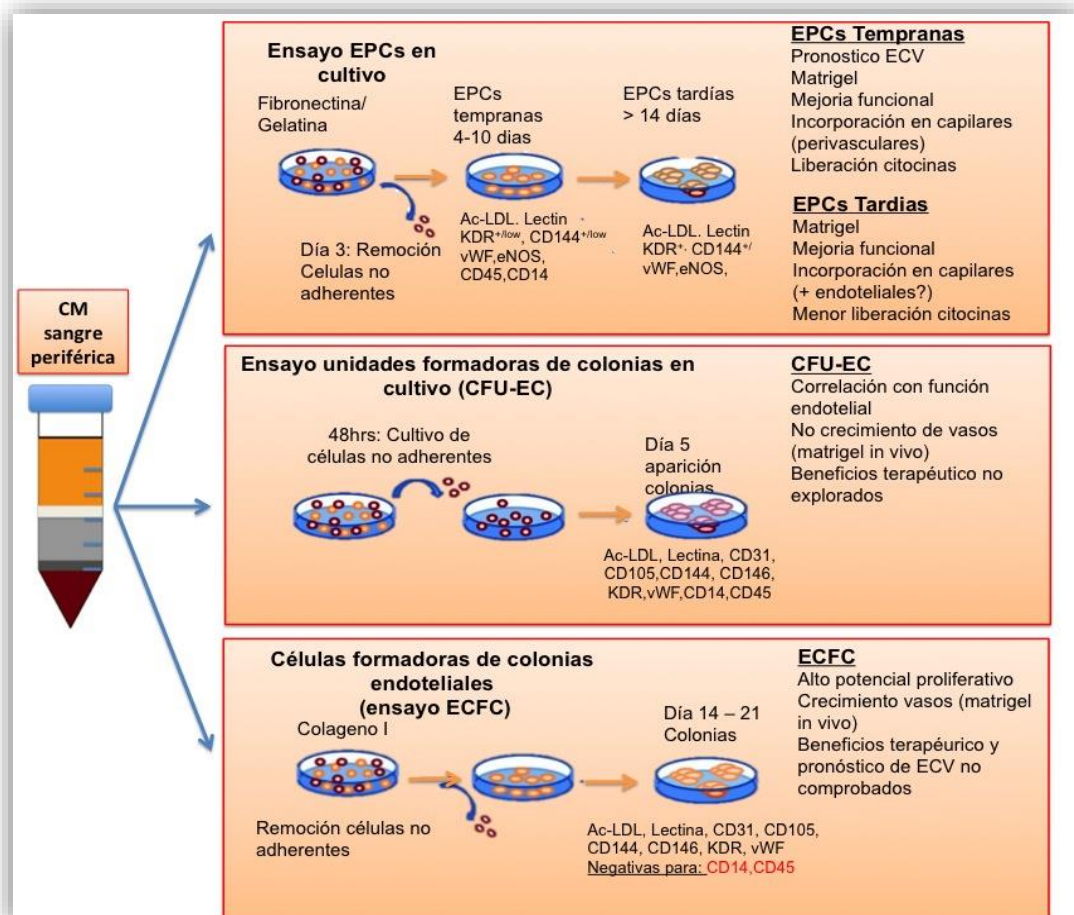


Figura 3. Protocolos para aislamiento de células progenitoras endoteliales (EPCs).
Modificado de Fadini y cols 2012.

Cabe mencionar que los enfoques aún son controvertidos, ya que los resultados siempre dependerán de la población de células a estudiar, su origen, factores genéticos, patologías concomitantes y sus tratamientos; y en caso de estudios in vitro, el modelo utilizado y las condiciones de cultivo empleadas. Esto dificulta predecir de forma fiable el comportamiento de las EPCs y su interacción con el endotelio.

2.1. Las EPCs en los procesos de reparación endotelial

La isquemia tisular, se considera el estímulo fisiológico más poderoso que regula las EPCs, las cuales se movilizan en un intento por restaurar la perfusión en las áreas isquémicas, contrarrestando la escasez de oxígeno y

nutrientes. Este proceso está estrechamente regulado por el factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) (Du et al., 2008).

En condiciones homeostáticas normales (**normoxia**), las EPCs estarán retenidas dentro de la MO (efecto de elevados niveles del Factor 1 derivado de células estromales (SDF1 α)), y el HIF-1 α es hidroxilado en residuos de prolina por hidroxilasas de HIF, reconocidas por la VHL ubiquitin ligasa y es rápidamente degradada por el proteosoma.

En condiciones de isquemia tisular (**hipoxia**), se inhiben las hidroxilasas, HIF-1 α se estabiliza y se dimerizan con el HIF-1 β . El heterodímero activo resultante se une al potenciador de regiones del ADN y promueve la transcripción de genes sensibles al oxígeno, que codifican, entre otros, a los principales reguladores de la movilización de las EPCs: VEGF y SDF-1 α (Resch et al., 2012). La disminución de los niveles de SDF1 α dentro de la MO creará un gradiente que guiará la movilización de las EPCs (Figura 4).

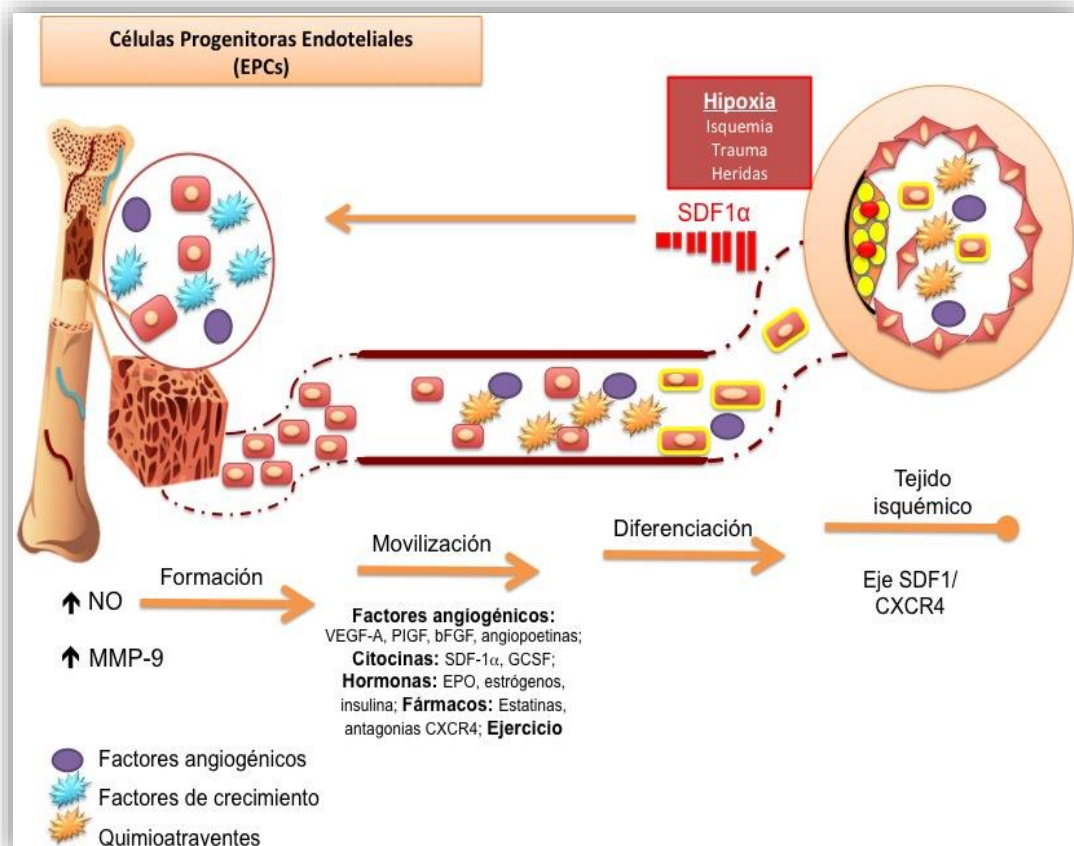


Figura 4. Representación esquemática del papel de las EPCs en los procesos de reparación endotelial. EPCs: células progenitoras endoteliales. Modificada de Hristov et al., 2003; Hristov y Weber, 2004; Iwami et al., 2004.

La movilización es un proceso complejo, consecuencia de la liberación de factores de crecimiento y citocinas, principalmente VEGF, así como FGF-2, GM-CSF, G-CSF, y angiopoyetina (Aicher et al., 2003; De Falco et al., 2004), las cuales inducirán la salida de las EPCs. El paso inicial es la activación de eNOS, aumento en la producción de NO que regulara la actividad de MMP-9, la cual es activada por SDF1 α , que escinde el ligando Kit asociado a la membrana en ligando Kit soluble (sKitL), atenuando así la interacción intercelular de las células progenitoras y permitiendo la movilización a la circulación periférica (Dimmeler et al., 1999; Heissig et al., 2002). Será aquí donde las EPCs responderán a la señalización por quimiocinas específicas del tejido dañado (eje SDF-1/CXCR4). Las EPCs se activarán y esta función estará mediada por IL-8 y CXCR2; oncogen-a regulador del crecimiento y CXCR1; CCL5 y CCR5 y las quimiocinas C-c y el receptor 2 y 5 de quimiocinas (Ishida et al., 2012). Una vez iniciado el proceso de activación, se ha postulado que las plaquetas expresan y liberan SDF1, lo que activaría CXCR4 en las células progenitoras, lo que conduciría a la adhesión y diferenciación endotelial (Stellos et al., 2008). Después, se iniciara el proceso de adhesión a las células endoteliales vasculares y posteriormente llevarán a cabo la migración transendotelial (migración a través de la membrana basal y de ECM dependiente de MMP-9), en los sitios de remodelado vascular. Aquí, contribuirán a la formación de nuevos vasos a través de:

- 1) incorporación directa en los neovasos,
- 2) diferenciación en células endoteliales maduras (mediado por fibronectina, VEGF, EGF)
- 3) producción de señales con efecto paracrino: VEGF, SDF-1, factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos-1 α , y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)(Balaji et al., 2013).

2.2 Función de las EPCs.

En el momento actual, las EPCs se consideran una herramienta clínica versátil. Inicialmente, los estudios se enfocaron en su papel diagnóstico, a través de la cuantificación directa (medición por citometría de flujo: CD133⁺/VEGFR-2⁺ o CD34⁺/VEGFR-2⁺ o CD34⁺/CD144⁺), a partir de un pequeño volumen de sangre periférica, como marcadores de la función vascular (Asahara et al., 1997; Fadini et al., 2012a; Fadini et al., 2012c).

La importancia clínica de estos precursores endoteliales circulantes en la adecuada función endotelial (Hill et al., 2003), ha quedado demostrada en la revisión de numerosos estudios (King and McDermott, 2014; Schmidt et al., 2015; Werner et al., 2005). La Figura 5 describe las principales condiciones que pueden influir en el aumento o disminución del número de EPCs en humanos:

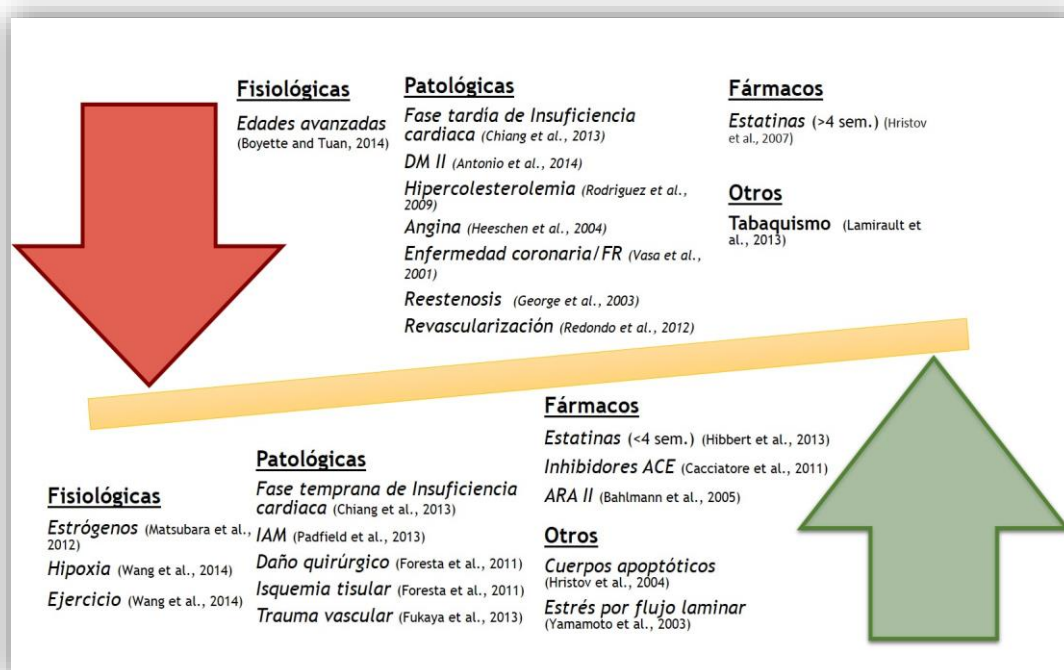


Figura 5: Principales condiciones que pueden influir en el aumento o disminución del número de EPCs en humanos

Posteriormente, las investigaciones se centraron en el papel regenerativo de las EPCs, con el objetivo de poder establecer una nueva terapéutica clínica en la enfermedad cardiovascular. El primer enfoque terapéutico de las EPCs post trasplante mostró con éxito la neovascularización y regeneración de los tejidos en un modelo murino con isquemia de extremidades posteriores (Kalka et al., 2000). Más adelante, otros estudios pre-clínicos (Dubois et al., 2010; Kawamoto et al., 2001; Kawamoto et al., 2006) describieron una mejoría post infarto en la función ventricular y reducción del tamaño del infarto, posterior a la infusión intravenosa de las EPCs en modelos animales; además de reportar que las EPCs eran capaces de diferenciarse en células endoteliales en sitios de neovascularización.

Las EPCs pueden ser separadas a partir de la sangre periférica o de la médula ósea y en pacientes con cardiopatía isquémica, se ha sugerido un beneficio en el uso terapéutico de las mismas (Assmus et al., 2006; Beeres et al., 2007; Fernández-Avilés et al., 2004; Jiménez-Quevedo et al., 2014; Jujo et al., 2008; Lunde et al., 2008; Schachinger et al., 2004), ya que se ha descrito mejoría de la fracción de eyección; mejoría en la perfusión post infarto; mejoría de circulación colateral (efecto angiogénico); disminución de la severidad en angina y mejoría en calidad de vida. Sin embargo, a pesar de estos resultados, la terapia basada en EPCs está aún pendiente de ser implementada en la práctica clínica diaria. Esto se debe a varios factores: la controversia en el resultado de varios estudios dependiente de la selección de EPCs y sus marcadores (Jimenez-Quevedo et al., 2014; Losordo et al., 2011; Losordo et al., 2007; Tse et al., 2007; van Ramshorst et al., 2009), así como, si es conveniente hacer una selección previa de células que expresen o no los marcadores; tampoco se conoce si es mejor inyectarlas de forma intracoronaria o intramiocárdica y por último, en la mayoría de ensayos clínicos no se han realizado estudios previos de funcionalidad para ver si las células infundidas son funcionantes o no.

En algunos estudios se ha establecido que las EPCs de sujetos con enfermedad cardiovascular tienen defectos en su funcionamiento in vitro. Sin embargo, cuando el plasma de pacientes cardiovasculares se incuba con EPCs obtenidas de donantes sanos, éstas tienen menos apoptosis y aumenta

su diferenciación endotelial (Consoli et al., 2013; Henrich et al., 2004). Así, en los últimos años la idea de que en la enfermedad cardiovascular aterosclerótica existe una liberación y diferenciación subóptima de EPCs desde su origen en la médula ósea, se ha tratado de responder, al tratar de modular el funcionamiento de las EPCs por diversos fármacos (Blum, 2014; Desouza, 2013; Roubille et al., 2013) o citoquinas (Albiero et al., 2013; Ferraro et al., 2011; Masuda et al., 2014) y dependiendo de las patologías concomitantes (Fadini and Avogaro, 2013; Ruiz et al., 2009; Ye et al., 2014).

Diversos estudios (Abe et al., 2013; Bhang et al., 2014; Di Santo et al., 2009) demuestran que, en modelos animales, se produce un efecto angiogénico in vivo similar cuando se usan EPCs o su medio condicionado, es decir, el medio sobrenadante de las EPCs en cultivo después de unos días de incubación o bajo condiciones de hipoxia. Esto, además de reforzar el papel fundamentalmente angiogénico de las EPCs, podría revolucionar la terapia con EPCs, ya que podría ser más fácil inyectar el medio condicionado que las propias EPCs. Es de destacar que este efecto aún no se ha demostrado en humanos. Si esto se demostrara, podría ser más sencillo utilizar el medio condicionado, ya que se dispondría, mediante el cultivo celular, de una literal “fuente” de angiogénesis *ex vivo*.

El reto de la investigación actual sobre las EPCs es el descubrimiento de marcadores de calidad (tales como los factores de transcripción) o moduladores (inhibidores de DPP4), que permitan predecir el daño y tratar de corregirlo antes de la aplicación como terapia en la enfermedad cardiovascular.

El éxito de estas estrategias depende del aislamiento y caracterización óptimos de las EPCs, si se someten a una adecuada modulación, se podría dirigir su proliferación, su movilización y su diferenciación, lo que permitiría una adecuada incorporación funcional en los tejidos adultos dañados y de esta forma desarrollar terapias celulares específicas.

3. Eje SDF1/CXCR4

La diabetes aterosclerótica es una enfermedad vascular caracterizada por disfunción endotelial, aumento de la actividad inflamatoria (adhesión de leucocitos, activación plaquetaria) y depósito de lipoproteínas aterogénicas (Ross, 1999; Zernecke y Weber, 2010). La respuesta inflamatoria que se crea a lo largo de la evolución de la aterosclerosis o después de la lesión endotelial de forma aguda, implica la movilización de células progenitoras que se rigen por moléculas de adhesión y quimioatrayentes. Estos quimioatrayentes o quimiocinas, constituyen una familia numerosa de citosinas que se clasifican en subgrupos basados en la posición de los dos primeros residuos de cisteína (CC, CXC, C, CX3C), con lo cual desempeñaran funciones específicas (Rajagopalan y Rajarathnam, 2006), y son secretados en áreas de inflamación, pero en la enfermedad cardiovascular aterosclerótica su papel aún continua en estudio.

La participación fundamental de CXCL12 (factor 1 derivado de células estromales / SDF-1 α) se ha descrito ampliamente durante la embriogénesis, la movilización de células hematopoyéticas proangiogénicas desde la médula ósea y en la angiogénesis (Doring et al., 2014; Zhang y Xu, 2014). La expresión de SDF1 se ha descrito en células de músculo liso, en células endoteliales y plaquetas, y su expresión parece estar aumentada en estados de disfunción endotelial y lesión vascular (Briasoulis et al., 2011; De Falco et al., 2004; von Hundelshausen y Schmitt, 2014) y se ha postulado su implicación en los procesos iniciales de revascularización post isquemia o en estados hipóxicos (Colombo et al., 2012; Jin et al., 2006). En modelos animales (Akhtar et al., 2013), se ha sugerido que puede tener un efecto estabilizador de la placa y en pacientes con angina estable o inestable, se ha detectado una disminución de los niveles plasmáticos de SDF1 (Garg et al., 2008). Otros estudios han reportado que los niveles plasmáticos elevados, se observan de forma transitoria después de la lesión mecánica o isquémica (Noels et al., 2014; Zernecke et al., 2005). Estudios más recientes han mostrado en pacientes, elevados niveles de SDF1 post IAM (Hu et al., 2007),

y en modelos experimentales, han reportado una mejoría de la función cardíaca, así como mayor migración celular (Rath et al., 2014; Saxena et al., 2008; Stellos et al., 2012; Tong et al., 2014) y han sugerido que podría considerarse como predictor de infarto o insuficiencia cardíaca (Tong et al., 2014).

El receptor de quimiocinas CXCR4, pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Es un receptor afín de SDF1 y se expresa de forma constitutiva en células hematopoyéticas y en células endoteliales, además, es un importante receptor que participa activamente en la regulación de la movilización de las EPCs y otras células progenitoras a los sitios de lesión (Ceradini et al., 2004), que posteriormente contribuirán a la formación de la neoíntima a través de la diferenciación en células parecidas a músculo liso y células endoteliales maduras. En modelos animales se ha demostrado que al bloquear la expresión de CXCR4, se observaba una disminución en la tasa de adherencia en arterias lesionadas y se abolía la capacidad de reparación endotelial por las EPCs (Li et al., 2011). En contraste se ha observado, en estudios in vitro, que al sobre expresar CXCR4 se mejoraba la capacidad de adhesión y migración, aumentando significativamente la capacidad de reendotelización por las EPCs post lesión (Yin et al., 2010). Estudios más recientes en modelos animales, han mostrado que CXCR4 es crucial en la reendotelización eficiente, mediada por EPCs (Noels et al., 2014).

El eje SDF-1/CXCR-4, juega un papel importante en numerosos procesos biológicos, incluyendo la hematopoyesis, cardiomiogénesis, vasculogénesis y el desarrollo neuronal, y ejerce un papel crucial en la modulación de la movilización de las células progenitoras desde la médula ósea (Wang y Luther, 2012), participando activamente en la supervivencia de las mismas y modulando sus señales proliferativas (Hopman y DiPersio, 2014). Se ha postulado el efecto cardioprotector por efecto del eje SDF1/CXCR4 (Akhtar et al., 2013; Hristov et al., 2007; Yin et al., 2010), implicación en el IAM (Saxena et al., 2008) y en los procesos de reestenosis (Yin et al., 2010),

hipotetizando que podría deberse a posibles alteraciones en reclutamiento de las EPCs (Doring et al., 2014). En los estudios donde se ha inhibido el eje SDF-1/CXCR-4 (modelos in vitro), se ha observado que interfiere con la lesión inducida por la hiperplasia de la neoíntima, esto es debido a la disminución del reclutamiento de células progenitoras de músculo liso CXCR4⁺, a la posible disminución de células inflamatorias en la lesión (Steinmetz et al., 2010), a un posible bloqueo parcial del anidamiento de las EPCs, secundario a la atenuación de las propiedades de adhesión y migración de las EPCs (Briasoulis et al., 2011).

Por otro lado, se ha observado que al infundir EPCs en modelos animales con lesión inducida, las EPCs mejoraban su adherencia en los vasos lesionados vía CXCR4 (Doring et al., 2014; Rennert et al., 2012).

En lo que respecta al papel del eje SDF1/CXCR4 en el desarrollo y evolución de la aterosclerosis, los datos aún permanecen inciertos, ya que los resultados han sido contradictorios sobre la presencia o función de las EPCs en la aterosclerosis, esto debido principalmente al modelo de aterosclerosis (etapa de la lesión) utilizados. Se requieren más estudios en pacientes para tratar de dilucidar el papel del eje SDF1/CXCR4 y su interacción con el microambiente (células endoteliales, células progenitoras endoteliales, células de músculo liso, células inflamatorias) y establecer una posible diana terapéutica efectiva.

4. Factor de transcripción endotelial Ets-2

La familia de los factores de transcripción Ets incluye a 26 factores de transcripción diferentes que juega un papel esencial durante el desarrollo embrionario/ en adultos, juegan un papel primordial en la regulación de la homeostasis, el desarrollo vascular y la angiogénesis (Dejana et al., 2007; Oettgen, 2006), ya que regulan la expresión de una gran variedad de genes implicados en la proliferación celular, la diferenciación y la supervivencia, y más recientemente se ha demostrado su implicación en reprogramación de los cardiomiocitos (Islas et al., 2012).

Actualmente los factores de transcripción Ets se han convertido en un elemento clave en el estudio de la angiogénesis y de la enfermedad cardiovascular, donde se ha hipotetizado una posible alteración en su regulación; estudios *in vitro* e *in vivo* (modelos animales), han demostrado que las alteraciones o desregulaciones podrían ser mayores en diabéticos (Seeger et al., 2009).

La participación de Ets2 también se ha relacionado con la regulación de la respuesta inmune, a través de la regulación de citoquinas como IL5 (Blumenthal et al., 1999) e IL12p40. Estudios recientes *in vitro* han mostrado la participación de Ets-2 en la regulación de la expresión de factores reguladores de la angiogénesis como Ang-2, VEGF, hemo-oxigenasa 1 (HO-1) y en factor de diferenciación CD13/APN (Randi et al., 2009). Además, existen datos de estudios de genoma completo (Wei et al., 2009), donde se ha corroborado que los polimorfismos en Ets-1 y Ets-2 están directamente relacionados con la enfermedad cardiovascular aterosclerótica, no existiendo estudios en humanos con resultados concluyentes. La sobreexpresión de Ets-1 y Ets-2 parece disminuir la expresión del marcador endotelial CD105 y este hecho podría mediar, al menos en parte, el importante papel de Ets-1 en la enfermedad cardiovascular diabética (Seeger et al., 2009). En placas ateroscleróticas humanas, estos factores se han relacionado con la angiogénesis patológica y la ruptura de la placa (Cheng et al., 2011), y se postuló que el fenómeno de desestabilización, se debía a la inducción de un fenotipo pro-inflamatorio de células endoteliales *in vitro* (Wei et al., 2013).

Además, los factores de transcripción Ets modulan la expresión de varios marcadores importantes de las EPCs, como CD144 y CD105 (Harris et al., 2010). De hecho, CD144 y CD105 son en sí mismos reguladores de membrana de la señalización por TGF-Beta 1 (Redondo et al., 2010; Redondo et al., 2007; Rudini et al., 2008).

A la par de estos hallazgos, surgieron investigaciones en las que se ha implicado a los factores de transcripción Ets-1 y Ets-2 en el control de la expresión del micro RNA - 126, y que ambos podrían influir en el estado de

inflamación vascular (Harris et al., 2010). Estudios más recientes han establecido que la liberación de miRNA-126 desde las células endoteliales apoptóticas reducían la formación de lesiones ateroscleróticas por un aumento en la regeneración de endotelio mediada por SDF1 (CXCL12) (Wei et al., 2013). Pero el estudio de la expresión en sangre de estos factores emergentes de transcripción en pacientes con riesgo cardiovascular no se ha determinado claramente en estudios de seguimiento en humanos (Figura 6).

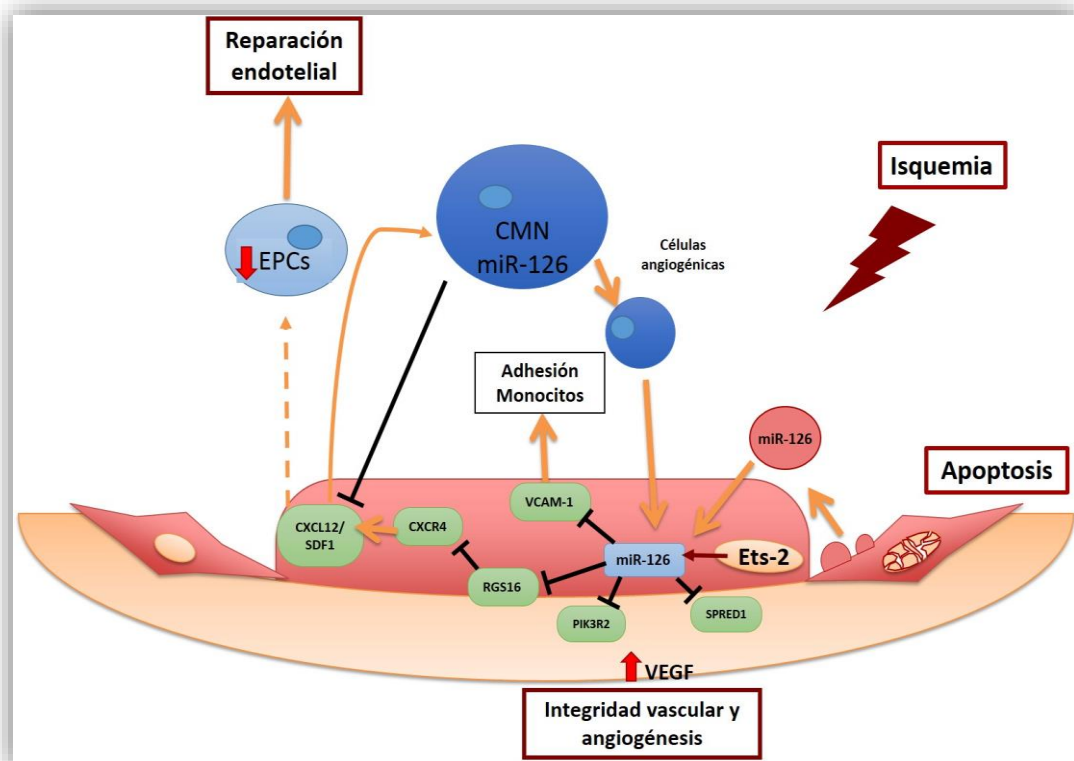


Figura 6. Implicación del factor de transcripción Ets-2 en los procesos de integridad vascular, isquemia y apoptosis y su interacción con el eje SDF1/CXCR4. Modificada de Wei et al., 2013

5. Incretinas: Inhibidores de dipeptidil peptidasa.

Las incretinas son hormonas intestinales secretadas por células enteroendocrinas del intestino que contribuyen a la regulación de la glucemia posprandial (Abu-Hamdah et al., 2009). Se han descrito dos incretinas principales, GLP-1 (péptido-1 similar a glucagón) y GIP (péptido insulínico dependiente de glucosa). Estas incretinas son secretadas al torrente circulatorio tras la ingesta de alimentos y actúan a través de la unión a su receptor en el páncreas promoviendo la secreción de insulina por

las células β (Figura +). Además las incretinas ejercen una acción antihiper glucémica a través de la inhibición de la secreción de glucagón y el enlentecimiento del vaciado gástrico y de la movilidad intestinal mediante su acción neuronal. En este sentido, en individuos sanos, el GLP-1 y el GIP son responsables del 50 al 70% de la respuesta insulínica postprandial, mientras que en pacientes con DM2, esta contribución puede ser menos del 20% (Meier and Nauck, 2010). En este sentido, se ha observado que el efecto incretina, fenómeno por el cual la glucosa oral genera una respuesta de insulina mayor que la glucosa intravenosa, está disminuida en pacientes diabéticos.

Por otro lado, se ha descrito la presencia de GLP-1R en otros tejidos: corazón, intestino, estómago, vasos, riñón, pulmón, músculo y cerebro, sugiriendo acciones directas e insulino-dependientes (Abu-Hamdah et al., 2009; Muscogiuri et al., 2014; Sivertsen et al., 2012). El GLP-1R está ligado a la proteína G y activa señales intracelulares que incluyen cAMP/PKA, PI3K/Akt y MEK/ERK (Zhao et al., 2014). Sin embargo, GLP-1 es susceptible a la actividad catalítica de la DPP-4 que actúa sobre los extremos NH₂ terminales y se degrada en pocos minutos. El metabolito generado es la amida GLP-1(9-36) que es la forma GLP-1 predominante en el plasma en el periodo post prandial por su lenta eliminación (Deacon and Ahren, 2011). Estudios experimentales sugieren que GLP-1 podría actuar como antagonista de GLP-1R o interaccionar con otros receptores específicos ejerciendo un efecto directo sobre el miocito cardiaco (Ban et al., 2008; Schirra et al., 1998). Estos hallazgos impulsan el interés sobre las incretinas GLP-1 y ; ➤ en el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de enfermedades que representan alteraciones metabólicas como la DM2 o en el IAM. Los fármacos basados en la acción de GLP-1 regulan el metabolismo de la glucosa a través de diferentes mecanismos y ejercen efectos adicionales a su acción antihiper glucemiante. Entre estos efectos se incluyen cambios en la presión arterial, función endotelial, peso corporal, metabolismo cardiaco, función ventricular, aterosclerosis o daño por insuficiencia renal. Los inhibidores de la DPP-4 ejercen un efecto más complejo puesto que aumentan los niveles de GLP-1 endógeno, disminuyen los de GLP-1F y modifican los niveles de

diversos péptidos diana de la DPP-4 con efectos cardiovasculares como el péptido-Y y péptidos natriuréticos (Figura 7).

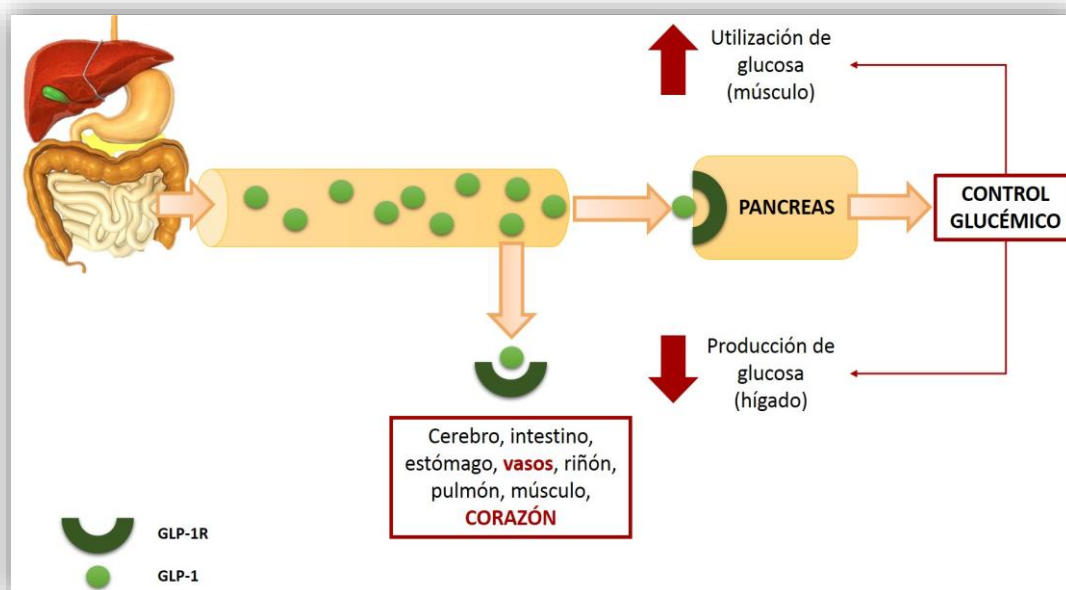


Figura 7. Mecanismos de acción de las incretinas. GLP-1 es secretado a la circulación sanguínea tras la ingesta de alimento y actúa incrementando la síntesis y liberación de insulina por el páncreas y disminuyendo la producción de glucosa hepática, lo que favorece el control glucémico. Se ha descrito la presencia de GLP-1R en otros órganos, entre ellos, el corazón, sugiriendo acciones directas de este péptido.

Los inhibidores de la DPP-4 desarrollados son la sitagliptina, la sexagliptina, la vildagliptina, la linagliptina y la alogliptina (Dicker, 2011). La sitagliptina aumenta las concentraciones plasmáticas de las formas activas de GLP-1 y GIP y, por tanto, sus efectos. En ensayos en pacientes con DM2, se demostró que la sitagliptina reduce la HbA1c y la glucemia en ayunas y posprandial (Plosker, 2014), así como disminución de marcadores de inflamación (Tremblay et al., 2014).

Además, se ha sugerido a los DPP4 como reguladores del tráfico y anidamiento de las EPCs vía SDF1 α (Christopherson et al., 2004; Huang et al., 2012; Theiss et al., 2011; Zhong et al., 2015), el cual es uno de sus sustratos y por lo tanto la inhibición o supresión de la DPP-4 aumentaría estos procesos.

Estudios experimentales con inhibidores de DPP4 (sitagliptina) han mostrado un efecto beneficioso en la función de las EPCs en modelos diabéticos (Goncalves et al., 2012). En la clínica, como efecto secundario, han demostrado la capacidad de aumentar los niveles circulantes de EPCs en pacientes diabéticos tipo 2, con posibles implicaciones cardiovasculares (Fadini et al., 2010). Más tarde, el mismo grupo de Fadini y cols., demostraron que en pacientes con DM tipo 2, los inhibidores de DDP-4 aumentaban los niveles plasmáticos de SDF1 α , a través de la supresión de su degradación por la actividad de la vía CD26/ DDP-4 y por lo tanto aumentan la movilización EPC desde la MO (Fadini, 2013). Actualmente, el efecto cardioprotector de los inhibidores de DPP-4 en estudios clínicos realizados hasta el momento no son concluyentes, ya que ninguno se ha realizado con un seguimiento de larga duración.

JUSTIFICACIÓN

La enfermedad cardiovascular (ECV) es la primera causa mundial de mortalidad. Las células progenitoras endoteliales (EPC) son moduladores importantes del mantenimiento y reparación del daño cardiovascular. Diversas condiciones, tales como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y/o aterosclerosis, se han relacionado con el agotamiento y la mala funcionalidad de las EPC, ya que ha sido relacionada con alteraciones en la adhesión celular y diferenciación de moléculas endoteliales. Esta expresión, es altamente dependiente del eje SDF1/CXCR4 y el factor de transcripción Ets-2. **Nuestro objetivo** fue determinar si el grado de expresión de Ets-2-SDF1 α /CXCR4 es capaz de predecir la liberación de células progenitoras endoteliales circulantes (EPCs), así como determinar la funcionalidad de las EPCs y su medio condicionado (expresión de SDF1/CXCR4, formación de colonias, adhesión en flujo, y diferenciación vascular) mediante su estudio en cultivo después de inhibir Ets-2 y del estudio de la adhesión y del efecto sobre la reactividad vascular de estas células en las arterias de pacientes con enfermedad cardiovascular (ECV). Determinar si existe alteración de la

expresión de SDF1/CXCR4 y Ets!2, en pacientes con DM tipo 2. Relacionar los datos encontrados con los parámetros clínicos y de laboratorio de los pacientes sometidos a cirugía. Así como su modulación por fármacos inhibidores de DPP4.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

- El factor de transcripción Ets-2, se relaciona de forma independiente con una deficiente funcionalidad de las EPCs en pacientes con enfermedad cardiovascular sometidos a revascularización miocárdica.
- Los Fármacos inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (Sitagliptina), modifican la expresión de moléculas de adhesión (eje SDF1/CXCR4) en las células progenitoras endoteliales; modulando su adhesión y regulando el tono vascular en arterias humanas, en un modelo “ex vivo” de reactividad vascular.

2. Objetivos

Objetivo 1.

Valorar la funcionalidad y el papel de las moléculas de adhesión en pacientes diabéticos y no diabéticos y/o ateroscleróticos sometidos a revascularización miocárdica, y su posible modificación por Sitagliptina.

- 1.1 Determinar las alteraciones en la expresión del eje SDF1/CXCR4 en las EPCs y su relación con parámetros clínicos.
- 1.2 Determinar el efecto de Sitagliptina en la expresión del eje SDF1/CXCR4 en las células progenitoras endoteliales en cultivo.

Objetivo 2.

Estudio de adhesión de las células progenitoras endoteliales y su funcionalidad en arterias humanas desendotelizadas.

- 2.1. Determinar el grado de alteración basal en la expresión del eje SDF1/CXCR4, en las arterias de los pacientes diabéticos y no diabéticos y/o ateroscleróticos, sometidos a revascularización miocárdica quirúrgica.
- 2.2. Determinar el efecto sobre la reactividad vascular, de las células progenitoras endoteliales en arterias humanas, en un modelo “ex vivo” de adhesión por flujo.
- 2.3. Determinar el efecto en la expresión del eje SDF1/CXCR4, de las células progenitoras endoteliales en arterias humanas, sometidas a la adhesión por flujo en un modelo “ex vivo” de reactividad vascular.

Objetivo 3.

Valorar el papel del factor de transcripción Ets-2 y su relación con moléculas de adhesión y regulación endotelial, en pacientes con enfermedad cardiovascular sometidos a revascularización miocárdica.

- 3.1. Determinar las alteraciones en la expresión del factor de transcripción Ets-2, en las EPCs de pacientes con enfermedad cardiovascular, sometidos a revascularización miocárdica, así como su relación con parámetros clínicos.
- 3.2. Determinar la interacción del factor de transcripción Ets-2 con otras moléculas de adhesión endotelial.
- 3.3. Determinar el efecto de la inhibición del factor de transcripción Ets-2, en la funcionalidad de las células progenitoras endoteliales en cultivo.
- 3.4. Determinar el efecto del medio condicionado, en la funcionalidad de las células progenitoras endoteliales en cultivos sometidos a inhibición del factor de transcripción Ets-2.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Pacientes

1.1 Diseño del estudio clínico

Se ha utilizado una cohorte, no probabilística, de pacientes sometidos a cirugía de revascularización miocárdica, del Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. La intervención quirúrgica fue decidida en cada caso por separado, por un comité del servicio de cirugía cardíaca, valorando estado clínico del paciente, procedimientos de cardiología intervencionista previos, grado de obstrucción y extensión de la lesión en cada arteria coronaria visualizada en estudio angiográfico.

Para la realización de los experimentos de reactividad vascular de la presente tesis doctoral, se han utilizado arterias mesentéricas de pacientes sometidos a cirugías abdominales, realizadas en el servicio de cirugía II del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, como muestra de vaso sanguíneo de desecho de cirugía abdominal. La intervención quirúrgica fue decidida en cada caso por separado, por un comité del servicio de cirugía II, valorando los antecedentes, el estado clínico del paciente y su patología de base, mediante estudios de analítica e imagen realizados previamente (para más detalle ver apartado 3.3.1).

Las muestras se obtuvieron siguiendo las normas de Helsinki, tras la aprobación del comité ético del hospital y con el consentimiento previo del paciente.

1.2 Criterios de selección de los pacientes

a) De Inclusión:

- Paciente programado para cirugía de revascularización miocárdica del servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital Clínico San Carlos.
- Edad de 30 a 80 años.
- Ambos géneros
- Aceptación a participar mediante consentimiento informado.

b) De Exclusión:

- Operación de recambio valvular simultánea.
- Reintervención cardíaca.

- Presencia de patologías que afecten al estado inflamatorio general (Insuficiencia renal o hepática diagnosticada).
- Pacientes con cáncer.

1.3 Procedimiento de recolección de datos

1.3.1. Variables socio-demográficas

Las variables sociodemográficas recogidas fueron: Edad, género, índice de masa corporal. Diagnósticos y tiempo de evolución de Diabetes Mellitus y medicamentos indicados, hipertensión arterial, enfermedad arterial periférica, hiperlipidemia. Consumo actual de tabaco, y durante el año previo a la cirugía. Antecedente de infarto de miocardio previo, puntuación obtenida en la escala Euroscore logístico y aditivo y fracción de eyección cardiaca (porcentaje).

1.3.2. Variables bioquímicas

Niveles séricos preoperatorios de glucosa, creatinina, tasa de filtración glomerular, leucocitos, monocitos y plaquetas.

1.3.3. Variables de seguimiento postoperatorio

Informe de complicaciones inmediatas, durante el postoperatorio: a) cardiovasculares (infarto miocárdico perioperatorio, arritmia grave, insuficiencia cardiaca); b) renales (insuficiencia renal aguda); c) pulmonares (síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto, neumonía); d) accidente cerebrovascular; e) muerte antes de su alta hospitalaria o durante los primeros 30 días del postoperatorio, de existir, día en que se presentó la complicación.

Los datos de cada paciente fueron recopilados para su manejo estadístico a través de la creación de una base de datos en el programa Excel Microsoft®.

2. Modelos de estudio para la evaluación de las moléculas de adhesión

2.1. Moléculas de adhesión en dácientes

2.1.1. Obtención de células progenitoras endoteliales (EPCs) en sangre periférica

Antes de ser sometidos al proceso de revascularización miocárdica, a cada paciente se le realizó la extracción de sangre (9ml) por el equipo de enfermería, se colocó en tubos con citrato de sodio tamponado 0.3ml-0.109M de BD Vacutainer®. Posteriormente se trasladó al laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina para ser procesado durante las siguientes 2 horas.

2.1.2. Separación de sangre en gradiente de densidad

La técnica de separación, se realizó en campana de flujo laminar, se extrae la sangre de cada tubo y se trasladó a dos tubos estériles, cada uno con Ficoll (Sigma, Alemania), en proporción 1:1, para su posterior centrifugación durante 25 minutos a 2400 rpm, con frenada paulatina a los 20 minutos. De este proceso se obtuvieron tres fases, (Figura 8).

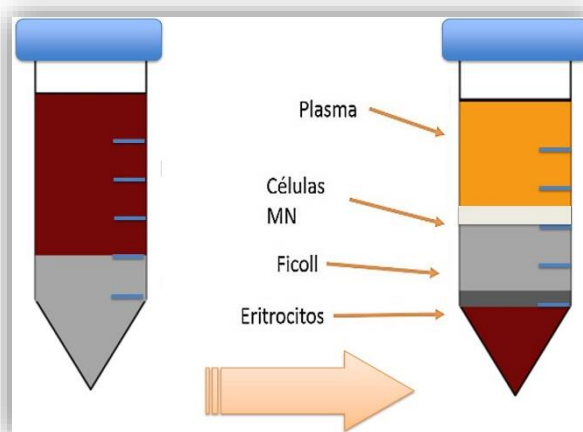


Figura 8. Separación de sangre por gradiente de densidades.

De la fase superior, se extrajo el suero por aspiración con pipeta serológica y se recolectó en tubos ependorff debidamente identificados, para su posterior análisis. La fase blanquecina de células mononucleares (fase intermedia), se extrajo y se trasladó a un nuevo tubo estéril, al cual se le agregó PBS estéril y se realizaron dos lavados mediante centrifugación

durante 7 minutos a 1500 rpm. Finalmente al pellet de células mononucleares que se obtuvo, se le agregó 400µl de buffer de lisis (Glicerol 50%, SDS 10%, 1 mol/l de Tris pH 6.8, 0.5 mol/l de EDTA y 5 mol/l de NaCl), trasladándose a un nuevo tubo eppendorf debidamente identificado y congelado a -20°C, hasta su posterior utilización.

2.1.3. Extracción de proteínas

Se cuantificó la concentración de proteínas por el método del ácido bicinónico. La lectura se realizó por espectrofotometría a 550nm (Lector de placas, Jupiter Asyshtech). Posteriormente se realizó la curva patrón, se ajustó la concentración final de proteínas de cada una de las muestras y se procedió a la determinación de la expresión de SDF1, CXCR4, Ets2, Endoglin y Erg por Western Blot (Tabla 1).

Proteína (Hopman and DiPersio)	Ac 1° (dilución)	Ac 2° (dilución)
SDF1 (10)	SantaCruz Anti-Rabbit (1:250)	Calbiochem (1:8000)
CXCR4 (40-47)	Abcam Anti-Rabbit (1:250)	Calbiochem (1:8000)
CD144 (130)	SantaCruz Anti-Mouse (1:250)	Calbiochem (1:10000)
CD105 (95)	SantaCruz Anti-Rabbit (1:250)	Calbiochem (1:8000)
Ets-2 (55)	SantaCruz Anti-Rabbit (1:250)	Calbiochem (1:8000)
Erg (55)	SantaCruz Anti-Rabbit (1:250)	Calbiochem (1:8000)
P53 (53)	SantaCruz Anti-Mouse (1:250)	Calbiochem (1:10000)
Actina (45)	SantaCruz Anti-Mouse (1:1000)	Calbiochem (1:10000)

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados, peso molecular y diluciones.

2.1.4. Técnica de Western- Blot

Para cuantificar las proteínas específicas, se utilizaron los lisados de células mononucleares, los cuales una vez descongelados se mezclaron con tampón de carga Laemmli (BIO-RAD®) y 5% de β -mercaptoethanol (BIO-RAD®) en relación 1:1 y se llevaron a 95 °C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Las proteínas (20 - 40 μ g) se separaron según su peso molecular mediante electroforesis a 100 voltios en un gel de acrilamida-SDS a una concentración de 4 - 15%.

Mediante aplicación de corriente eléctrica, las proteínas separadas en los geles se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinil (PDVF) (Trans-Blot® Turbo™ Midi PVDF Transfer Packs, BIO-RAD), mediante transferencia semi-seca (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, BIO-RAD), durante 7 minutos con el protocolo MIXED MW. El bloqueo para los sitios de unión inespecíficos se realizó con 5% de leche en polvo semidesnatada en TBS-Tween® (Tris 25 mM, NaCl 75mM, Tween 20 0.1%, pH 7.4), durante una hora y media en agitación a temperatura ambiente.

La incubación con anticuerpos primarios se realizó en solución TBS-Tween 0.1%, a 4°C, en agitación continua toda la noche. Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: anti-ratón conjugado con peroxidasa (CALBIOCHEM®), dilución 1:10000 y anti-conejo conjugado con peroxidasa (CALBIOCHEM®), dilución 1:8000, según la proteína estudiada. La inmunoreactividad se determinó por quimioluminiscencia con ECL (Pierce®, Thermo Scientific) y se visualizó mediante un sistema de detección Odyssey FC (LI-COR). La expresión de proteínas se cuantificó mediante análisis densitométrico de la banda y con planimetría semi-cuantitativa con el programa Image J. Se tomó la expresión de beta-actina como proteína constitutiva de referencia y la expresión en cada canal se refirió como “veces más”, tomando lo encontrado en la muestra control como la unidad de referencia (Laemmli, 1970).

SDF-1 α circulante es un ligando específico de CXCR4, pero debido a que diversos estudios han demostrado que CXCR4 está presente en las plaquetas, se determinó la concentración plasmática libre, realizando los siguientes pasos: 1) una centrifugación del plasma a 1000 g por 15 minutos, a los 30 minutos de haber obtenido las muestras y 2) una segunda centrifugación a 10000 g durante 10 minutos a -4° C. Posteriormente, para la cuantificación de los niveles de SDF-1 α se utilizó un kit de ELISA (Enzimoimmunoensayo) de fase sólida específico para SDF-1 α humano (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos) que se basa en una lectura a una longitud de onda de 450 nm y corrección con una segunda lectura a 540nm (Lector Multi-Modal Synergy 2, Biotek), para corrección de los niveles estimados. Los límites de detección del ensayo son 156 - 10,000 pg/mL.

2.2. Moléculas de adhesión en cultivos de células progenitoras endoteliales

2.2.1. Aislamiento y cultivo de células progenitoras endoteliales humanas

Se utilizaron los residuos leucoplaquetarios de donantes sanos, tras la separación de los hemoderivados. Este material se obtuvo del Centro Estatal de Transfusiones de Madrid. La sangre se extrajo (40 ml), en la campana de flujo en condiciones de esterilidad, utilizando una jeringa estéril de 50 ml (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), se trasladó a tubos estériles de 15 ml con Ficcoll (Sigma, Alemania) y se realizó un procedimiento de separación de células mononucleares por gradiente, descrito previamente en el apartado 2.1.&. Las células mononucleares obtenidas fueron sembradas en placas estériles de 6 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca), a 10 millones de células por pocillo. Cada pocillo se pre-trató con 1 ml de fibronectina humana a 10 μ g/ml (Tebu-Bio). Las células se mantuvieron en medio de cultivo MV-II (PromoCell), específico de crecimiento endotelial microvascular, suplementado con 5% de FBS y aditivos. Se realizó el cambio de medio el cuarto día y los experimentos se realizaron el séptimo día de cultivo. Las células se mantuvieron en incubadora de cultivo celular

2.2.2 Efecto de los inhibidores de DPP4 en cultivos de células progenitoras endoteliales

Para evaluar el efecto de los inhibidores de DPP4 en cultivos de células progenitoras endoteliales, se agregaron diferentes concentraciones (1, 2 y 5 μM) de Sitagliptina a las 6, 12 y 24 horas previas al séptimo día de cultivo. Después de finalizar el tratamiento, se extrajo el sobrenadante (350 μl) y se colocó en tubos eppendorf, para realizar en un segundo tiempo la cuantificación de SDF-1 α , de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 2.2.1.

Posteriormente, a cada cultivo sin sobrenadante, se le realizaron 2 lavados con PBS frío, se agregó la solución de lisado, se cuantificó la concentración de proteínas por espectrofotométrica y se procedió a la determinación de SDF1, CXCR4 y p53 por Western blot. Se tomó la expresión de β -actina como proteína constitutiva de referencia.

3. Métodos de adhesión de las células progenitoras endoteliales y su funcionalidad en arterias humanas desendotelizadas

3.1. Estudio histomorfométrico

Para determinar la interacción entre la lesión del vaso (hiperplasia neointimal) y el eje SDF1/CXCR4, se realizó la caracterización de las arterias mamarias internas, realizando el estudio histomorfométrico de las mismas. El cual consistió en determinar las siguientes medidas en las arterias de pacientes diabéticos y no diabéticos y/o ateroscleróticos:

Medidas iniciales:

- LEE: área incluida dentro de la lámina elástica externa
- LEI: área delimitada por la lámina elástica interna
- AL: área ocupada por la luz de la arteria

Medidas secundarias:

- ATM: área de la túnica media (LEE- LEI)

OCUPA EL ÁREA DE LA LEI

$$[1-(AL/LEI)] \times 100$$

- Índice AN/LEE: relación entre el AN y el área de LEE

3.2 Estudio inmunohistoquímico. Expresión del eje SDF1/CXCR4, en las arterias de los pacientes revascularizados diabéticos y no diabéticos y/o ateroscleróticos

Para determinar la expresión en el eje SDF1/CXCR4, se utilizaron las arterias de pacientes ateroscleróticos diabéticos y no diabéticos, sometidos a revascularización miocárdica quirúrgica. Se han utilizado arterias mamarias internas al ser estas las más utilizadas en Cirugía cardíaca de revascularización coronaria. El estudio se ha realizado con los segmentos sobrantes de estas arterias, provenientes de las cirugías de revascularización del Hospital Clínico San Carlos (Madrid), estos segmentos de arteria mamaria interna fueron recogidos en el quirófano en un tubo falcon de 15 ml, el cual contenía medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) con penicilina, estreptomicina y anfotericina B al 1% (Gibco - Invitrogen life technologies), posteriormente se trasladaron, en los 30 minutos siguientes, en condiciones asépticas y en contenedores con hielo para su utilización al laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina, en el laboratorio cada segmento de arteria fue limpiado de grasa y adherencias y se realizaron 2 lavados con PBS frío, se incluyeron en PFA al 4% para su fijación, y posterior utilización.

3.2.1. Localización intracelular de proteínas por microscopía confocal

La localización y expresión de las proteínas SDF1 y CXCR4, se realizó mediante la técnica de inmunofluorescencia en cortes histológicos de los segmentos de arterias mamarias internas. Cada segmento de arteria después de ser fijado en PFA al 4% se deshidrató en concentraciones crecientes de etanol (70°, 90° y 100°) y butanol y finalmente se incluyeron en parafina líquida a 60° durante toda la noche y al día siguiente se colocaron en moldes debidamente etiquetados, se dejaron enfriar y se extrajeron los bloques.

Posteriormente se realizaron cortes de 7 micras de espesor con micrótopo (Leica), se recogieron en laminillas tratados con 3-aminopropiltietoxisilano (Fluka, Buchs, Suiza) diluido al 2% en acetona y se desecaron en una estufa de secado a una temperatura de 50° durante 24 horas.

Tras desparafinarlos e hidratarlos, se efectuó el desenmascaramiento antigénico por calor con tampón citrato (pH: 6,1), durante 20 minutos a 95°C. Se realizaron dos lavados con TBS y posteriormente 5 lavados de 5 minutos con TBS-Tritón 0.3%. Tras el último lavado se montó en cámara húmeda y se bloquearon las uniones inespecíficas (TBSx 0.3% + 10% goat serum + 3% BSA) durante una hora a temperatura ambiente. Se retiró el exceso de líquido y se añadieron los anticuerpos primarios específicos de SDF1, monoclonal de ratón (R&D SYSTEMS®) y CXCR4, policlonal de conejo (abcam®) y se incubaron en solución TBSx 0.3% + 2.5% goat serum en diluciones de 1:50, 1:100 y 1:200 respectivamente durante 48 horas a -4°C.

Los anticuerpos secundarios correspondientes Alexa 488 goat (Molecular probes®), anti ratón y Texas Red goat (Molecular probes®), anti conejo, se incubaron durante toda la noche a 4°C en dilución 1:200 en una solución TBSx 0.3% + 2.5% goat serum. Finalmente, posterior al lavado con TBSx 0.3% y secado, las preparaciones se incluyeron en el medio de montaje Vectashield hard set con DAPI (VECTOR®) y guardadas en nevera a 4°C para su posterior estudio.

Para verificar que no existieran reacciones cruzadas entre los anticuerpos primarios y secundarios, se realizaron incubaciones con cada uno de los anticuerpos por separado y después con ambos anticuerpos secundarios. De la misma forma, se realizaron experimentos a diferentes tiempos hasta establecer en tiempo óptimo que no mostrara un exceso de marcaje.

La visualización de las proteínas se realizó por microscopia de inmunofluorescencia (microscopio confocal OLYMPUS FU1200), la cuantificación de la expresión de la proteína en estudio se realizó mediante planimetría semi-cuantitativa con el programa Image J. El valor positivo se restó al del control negativo y el porcentaje de diferencia fue referido como “veces más expresado que en muestra control”.

3.3 Modelo “ex vivo” de reactividad vascular

Los experimentos del estudio de la reactividad vascular de la presente tesis doctoral, se llevaron a cabo en arterias mesentéricas humanas, a través de las cuales se hizo pasar un flujo de células progenitoras endoteliales (EPCs) provenientes de población sana. Las EPCs fueron cultivadas de acuerdo con el protocolo de experimentación descrito anteriormente en el apartado 2.2.1. Al día 7 de cultivo, las células se levantaron con Acutasa (Laboratorios PAA, Unz, Austria), y se re-suspendieron a una concentración de 350.000 células/ml en medio HBSS suplementado con Ca^{2+} (1 mM) y Mg^{2+} (1 mM), y se procedió a realizar el experimento de adhesión por flujo como a continuación se detalla ampliamente.

3.3.1 Arterias mesentéricas

Debido a su tamaño y grosor, las arterias mamarias no permiten una adecuada visualización de las mismas en la cámara de reactividad (Miógrafo de Mulvany y Nyborg de presión por flujo), por lo que, para realizar los experimentos de reactividad vascular se utilizaron arterias mesentéricas de pacientes sometidos a cirugías abdominales, realizadas en el servicio de cirugía II del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Las arterias se obtienen como muestra de vaso sanguíneo del desecho de cirugía abdominal. La intervención quirúrgica fue decidida en cada caso por separado, por un comité del servicio de cirugía II, valorando estado clínico del paciente y su patología de base, mediante estudios de analítica e imagen realizados previamente.

El estudio engloba arterias mesentéricas de pacientes de 30 a 90 años. Cada paciente es entrevistado y se dispone de la siguiente información: edad, género, índice de masa corporal, así como antecedentes de: diabetes, hipertensión, hipercolesterolemia, tabaquismo y neoplasia.

El tejido graso abdominal se extrajo en el quirófano, inmediatamente se colocó en un tubo falcon estéril, el cual contiene medio de cultivo RPMI

suplementado con 1% de antibiótico y se mantuvo en nevera (4°C) hasta su transporte al laboratorio de farmacología. El segmento arterial se limpió bajo una lupa binocular en un microplato de disección, el cual contenía solución salina fisiológica (SSF) fría, con la ayuda de unas pinzas y tijeras de microdisección, eliminando todo el tejido conectivo y tejido graso circundante, tratando de no dañar los segmentos arteriales. El procedimiento se realizó manteniendo el tejido frío y burbujeado con carbógeno (solución gaseosa, mezcla de CO₂ 5% + O₂ 95%).

Debido a que durante la operación, las muestras podrían haber sufrido algún tipo de daño, se excluyeron las arterias que presentaran las siguientes características:

- Arterias con daño mecánico (ocasionado por uso de clips, grapas, suturas, mallas metálicas o cauterización).
- Arterias que sufrían isquemia (ocasionado por bloqueo de los vasa vasorum o por almacenamiento en condiciones de hipoxia).
- Arterias con daños químicos o térmicos (exposición a soluciones con alteraciones en el pH, osmolaridad, temperatura).
- Arterias que sufren distensión manual bajo presiones no controladas para evitar áreas espasmódicas.

3.3.2. Protocolo de experimentación

Se utilizaron anillos de arteria que tenía una longitud de 15 mm, tras su cuidadosa disección, se procedió a denudar el endotelio del vaso, en este punto los anillos se montaron, en una cámara de flujo y se procedió a anudar los extremos del anillo a los capilares abiertos de vidrio de la cámara mediante sutura quirúrgica de 6-0, consiguiendo una estructura tubular abierta que permitió el paso de una solución. La arteria se encontraba sumergida en un baño de órganos que contenía 10 ml de solución fisiológica de Krebs a 37°C, que se mantuvo a temperatura constante empleando un baño termostático con bomba de infusión (Figura 9).

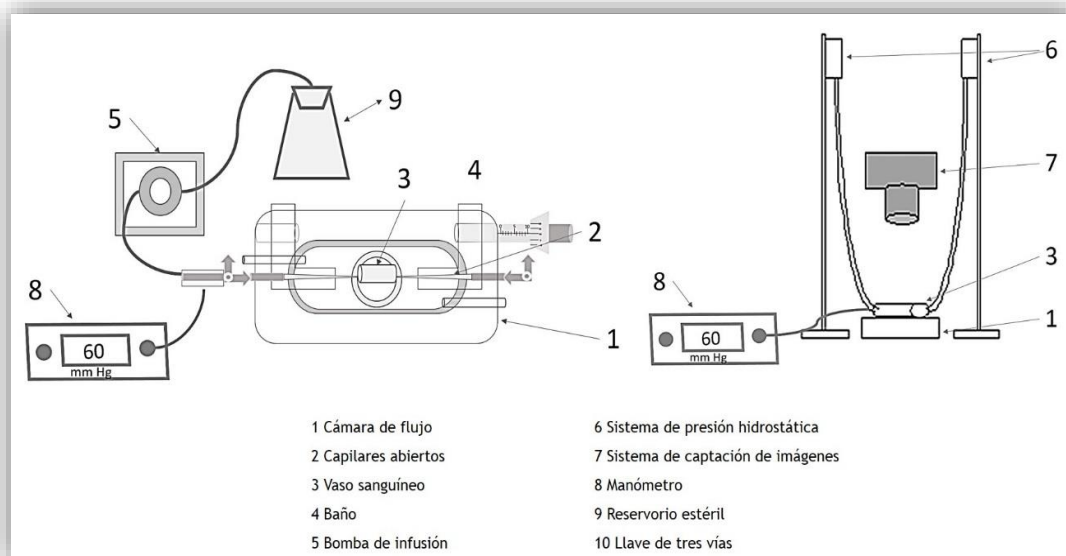


Figura 9. Representación esquemática del modelo de adhesión por flujo (bajo patente).

Con el circuito abierto se procedió a perfundir el tampón de Krebs a 37°C (se mantuvo la temperatura del tampón empleando un baño termostático) y se dejó estabilizar la arteria durante 40 minutos. Se registró el diámetro externo del vaso mediante una cámara Nikon Digital Sight DS-Vi1, de alta tasa de disparo, acoplada a un microscopio Leica DM IL LED, registrándose como se aprecia en la Figura 9. Posteriormente, se procedió a cerrar el circuito para obtener la presión deseada que, para una arteria de diámetro menor (en condiciones basales, sin presión), fue de 40mmHg y para una arteria de diámetro mayor fue de 70mmHg. La presión se obtuvo elevando el sistema de columnas acopladas a la cámara (Figura 10), hasta que el manómetro indicó la presión transmural deseada. Se dejó estabilizar durante 15 minutos y se midió el diámetro externo (después de aplicar presión) con el sistema anteriormente descrito.

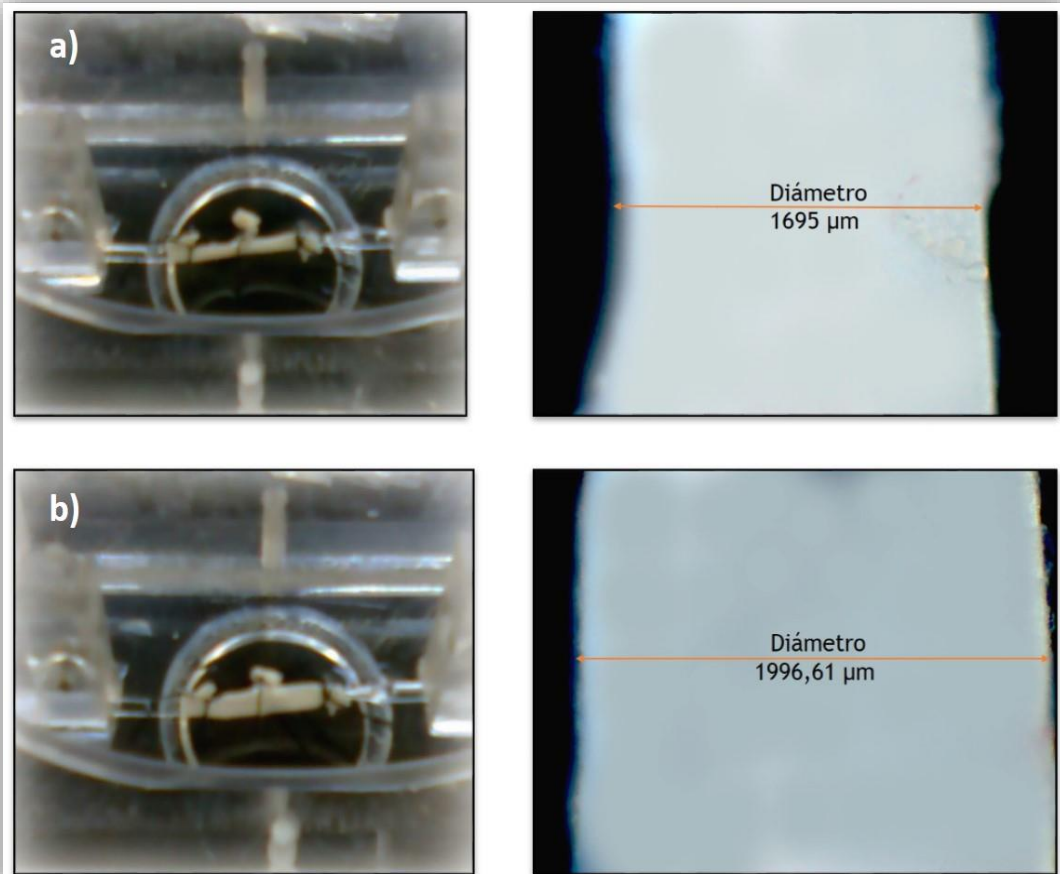


Figura 10. Segmento de arteria mesentérica acoplado al sistema de capilares en a) sin presión y en b) con presión.

Se corroboró la funcionalidad del vaso, sustituyendo el tampón de Krebs del baño de órganos por Krebs alto potasio (K^+ 80 mM), la respuesta positiva indicó que el vaso era funcional, se realizaron tres lavados con tampón Krebs a 37°C para que el vaso volviera a su estado inicial, finalmente se dejó estabilizar durante 30 minutos.

Posteriormente, se expuso el vaso a una serie de sustancias vasoactivas que se añadieron al baño de órganos (10ml). Primero se añadió una sustancia vasoconstrictora ($NA\ 10^{-5}\text{ M}$) y se registró la contracción obtenida. Después, se añadió una sustancia vasodilatadora ($ACh\ 10^{-5}\text{ M}$) y se registró la relajación obtenida. Se realizaron tres lavados con tampón Krebs a 37°C para que el vaso volviera a su estado inicial y se dejó estabilizar durante 30 minutos.

Se abrió el circuito para permitir el paso a través de las arterias, de un flujo constante (0,1 y 0,3 ml/min), de la suspensión de células progenitoras endoteliales (350.000 células/ml) en solución HBSS, suplementado con Ca^{++} (1 mM) y Mg^{++} (1 mM), por medio de una bomba de infusión, por un periodo de 1 hora. Las EPCs en suspensión, se mantuvieron en un depósito estéril, a una temperatura constante de 37°C bajo agitación suave.

A continuación, después de la perfusión, se cerró el circuito, se dejó estabilizar la arteria y se procedió a realizar nuevamente los protocolos de experimentación para evaluar la reactividad vascular con las sustancias NA y Ach, registrando los nuevos valores de contracción y relajación obtenidos, para poder estudiar el efecto de reparación de las EPCs. Una vez terminado el experimento, se realizaron estudios de inmunohistoquímica, con la técnica descrita en el apartado 3.2.1 para evaluar la adhesión de las EPC en la pared arterial.

4. Estudio del factor de transcripción Ets-2

Para estudiar el papel del factor de transcripción Ets-2 y su relación con moléculas de adhesión y regulación endotelial, se realizó la determinación de su expresión en células progenitoras endoteliales en sangre periférica, con los protocolos descritos previamente en los apartados 2.1.2 a 2.1.4. Los resultados obtenidos se correlacionaron con los parámetros clínicos de los pacientes y se verificó su interacción.

4.1 Inhibición mediante siRNA

Para determinar el efecto inhibitorio del factor de transcripción Ets-2, se silenció la expresión por siRNA en cultivos de células progenitoras endoteliales y se verificó por prueba de Western - blot. Para realizar el silenciamiento de los factores de transcripción, se utilizó un agente de transfección siPORT NeoFX (Ambion), el cual se diluyó en medio OPTI-MEM I (5µL/100 µL), previamente atemperado y se incubó por 10 minutos. Se diluyeron los silenciadores *Silencer® Select siRNAs* (**SiRNA control**,

SiRNA4850, SiRNA4851, SiRNA4852) en el medio OPTI-MEM I, primero cada uno por separado y después en combinación, hasta obtener la inhibición óptima de trabajo. La concentración final fue de 5 μ M para cada uno. Posteriormente se mezclan con el agente de transfección siPORT NeoFX y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir la formación de los complejos de transfección. Finalmente se agregaron a cada uno de los pocillos de cultivo.

A las 24 horas de la transfección, se retira el medio con OPTI-MEM I y se agrega medio MV-II. Se realizó el cambio de medio el cuarto día y los experimentos se realizaron al séptimo día. Las células se mantuvieron en una incubadora de cultivo celular (Mettler, Schwabach, Alemania), en condiciones estériles, a 37° C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

En el séptimo día, se realizaron los experimentos siguientes:

- Recogida de medios condicionados
- Contaje de unidades formadoras de colonias (UFC).
- Extracción de proteínas y determinación por Western - blot.

4.2. Evaluación del medio condicionado en cultivo

Para evaluar si el medio condicionado es capaz de reproducir un efecto similar a las células progenitoras endoteliales, debido a las secreciones celulares que quedan sobre ellas en los pocillos de cultivo, se realizó el siguiente experimento:

Se recogió el sobrenadante de los cultivos de los experimentos realizados en el apartado 4.1. Se centrifugó a 1500 rpm, durante 10 minutos y el sobrenadante se llevó a un nuevo tubo eppendorf y se agregaron 250 μ l de SupplementMix (Promocell). Posteriormente, el medio condicionado suplementado se agregó al cuarto día, en los cultivos de células progenitoras endoteliales durante 72 horas el séptimo día se realizó el contaje de unidades formadoras de colonias (UFC), y finalmente se realizó la extracción de proteínas y se verificó la expresión de proteínas SDF1, CXCR4, y endoglin por Western - blot.

5. Descripción operacional de las variables

5.1. Variable Dependiente

Expresión de SDF1: expresión en unidades arbitrarias o en porcentaje respecto al control, según el método de evaluación.

5.2. Variables independientes

En el protocolo de recogida de datos se han incluido 20 variables independientes, su codificación, definición operacional y escala de medición se detallan en las Tablas 2 y 3.

Las variables experimentales, definición y unidades de medición fueron definidas en la descripción del procedimiento.

VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS				
CÓDIGO	NOMBRE	SIGNIFICADO	ESCALA DE MEDICIÓN	VALOR
EDAD	Edad del paciente	Años cumplidos al día de la cirugía	Continua	Años cumplidos
Sexo	Género del paciente	Fenotípico	Discreta, dicotómica	0=Mujer, 1=Hombre
IMC	Índice de masa corporal	Determinada por fórmula de Quetlet	Continua	IMC=peso/talla ²
Tab	Tabaquismo actual	Tabaquismo durante el último año	Discreta, ordinal	0= NO, 1= Si, 2= Ex fumador
DM	Diabetes Mellitus tipo 2	Referida por paciente, HC, consumo de HGO, insulina	Discreta dicotómica	0= NO, 1= Si
HAS	Hipertensión Arterial y tiempo de evolución en meses	Referida por el paciente o HC	Compuesta: Discreta dicotómica y Continua (meses de evolución)	0= NO, Cualquier número diferente será si y evolución en meses
HLP	Hiperlipidemias	Referida por el paciente o HC	Discreta, dicotómica	0= No, 1= Si
OBE	Obesidad	Clasificación de acuerdo con OMS por IMC	Discreta, ordinal	I= 19 - 24,9 II= 25 - 29,9 III= 30 - 34,9 IV= 35 - 36,9 V= >40

HGO	Ingesta de hipoglucemiantes orales	Referida por el paciente o HC	Discreta, nominal	0= No, 1= Metformina 2=GLP1 3= Inh DPP4
AI	Aplicación de Insulina	Referida por el paciente o HC	Discreta, dicotómica	0= No, 1= Si
IAMP	Infarto Agudo previo	Infarto previo y días antes, referida por el paciente o HC	Discreta ordinal	0= No, 1= <30 días 2= 31 a 90 d, 3=>90 d
EuroS	Escala de EuroSCORE	Calculado antes de la cirugía	Discreta, ordinal	Puntaje de 0 a 15
FE	Fracción de eyección	Referida por estudio hemodinámico previo	Continua	Porcentaje reportado

Tabla 2. Codificación, descripción operacional y escalas de medición empleadas en las variables Sociodemográficas analizadas en el estudio.

VARIABLES BIOQUÍMICAS				
CÓDIGO	NOMBRE	SIGNIFICADO	ESCALA DE MEDICIÓN	VALOR
Gluc	Glucosa sérica	Medición en suero	Continua	Valor expresado en mg/dl
Creat	Creatinina	Medición en suero	Continua	Valor expresado en mg/dl
FG	Filtrado glomerular	Calculado por la fórmula de Cockcroft-Gault corregida por superficie corporal	Continua	Valor expresado en ml/min/1,73m ²
SDF-1α	SDF-1α	Concentración plasmática libre	Continua	Valor expresado en pg/ml
Mon	Monocitos	Medición en sangre	Continua	Valor en células/microL
PlaQ	Plaquetas	Medición en sangre	Continua	Valor en u/mcL

Tabla 3. Codificación, descripción operacional y escalas de medición empleadas en las variables bioquímicas analizadas en el estudio.

6. Aspectos estadísticos

Para cada variable, se realizó un análisis descriptivo, los datos cuantitativos se expresan como media y desviación estándar (DS) si su distribución cumple los requisitos de normalidad y mediana y mad como medidas de tendencia central y de dispersión respectivamente, si no son paramétricas. Los datos cualitativos se expresan en porcentaje o distribución de frecuencia.

El análisis bivariado por diagnóstico de diabetes mellitus de los datos socio-demográficos, bioquímicos y de seguimiento se efectuaron con pruebas de Chi-cuadrada, exacta de Fisher, t de Student o U de Mann-Whitney según correspondió.

Los análisis comparativos de valores de expresión de SDF1, CXCR4, endoglina, Erg y Ets-2 en las EPCs y tejido arterial, así como de los valores séricos de SDF-1 α en sujetos diabéticos y no diabéticos se realizaron con prueba de t de Student si la distribución tenía criterios de normalidad.

Las comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA o su equivalente no paramétrico y con prueba de HSD de Tukey post-hoc si la Anova era significativa. El análisis exploratorio de asociación entre variables se realizó con el coeficiente de correlación de Pearson si ambas variables tenían distribución normal y con la prueba de correlación resistente en caso contrario (Rousseeuw y Van Zomeren, 1990).

Los análisis de regresión múltiple se realizaron por selección del mejor modelo, esto es determinar las contribuciones únicas de varios factores de riesgo a un solo evento o resultado, el cual se determina mediante el uso de la técnica escalonada con eliminación de variables por pasos sucesivos para determinar las variables explicativas en el modelo. Se consideró un modelo inicial con todas las variables y se extrajeron aquellas con un valor de $p \leq 0.5$ para realizar un nuevo modelo. La entrada y la salida de variables en los pasos sucesivos se estableció para los valores de $p < 0.05$ y $p \geq 0.20$, respectivamente, hasta obtener las variables que tuvieran significancia, se

corroboró el modelo, el tipo de relación y se efectuó el análisis Eta^2 para determinar la contribución porcentual de cada variable en el modelo explicativo o la asignación del riesgo a cada variable en el modelo de predicción (Cohen y Cohen, 1975).

7. Aspectos Éticos

Se obtuvo la autorización del comité ético del Hospital Clínico “San Carlos” para la realización de este estudio. Es un estudio de bajo riesgo, ya que es observacional, prospectivo. El segmento de arteria para estudio se utilizó solamente si había material sobrante de la cirugía, sin embargo, se obtuvo consentimiento informado de todos los pacientes para la cirugía y la utilización del material quirúrgico con fines de experimentación.

8. Financiación

Los estudios de cultivo celular, Wester-bot, reactividad vascular, manejo informático de la base de datos y análisis estadístico se realizaron en el laboratorio de la Prof. Teresa Tejerina, en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense.

Los estudios de inmunohistoquímica, se realizaron en el Departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense.

El estudio de microscopía confocal se practicó en las unidades de microscopia del Área de Ciencias Biológicas (CAI) de la Universidad Complutense de Madrid.

Para la realización de este trabajo se contó con financiación del Fondo de Investigaciones Sanitarias mediante el FISS PI12-00590.

Úrsula Fabiola Medina Moreno contó con la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT)-Gobierno del Estado De San Luis Potosí (Reg. 215062, CVU 308929), a través del programa para la formación de recursos humanos de Alto nivel en programas de posgrado de calidad en el Extranjero.

IV. RESULTADOS

Análisis descriptivo de los pacientes estudiados

En la presente tesis doctoral, se incluyeron un total de 90 pacientes sometidos a revascularización miocárdica, en el periodo comprendido de enero de 2012 a diciembre de 2014 en el servicio de cirugía cardiaca del Hospital Universitario Clínico San Carlos. Las principales características de la cohorte estudiada están resumidas en la tabla 5. Se eliminaron 3 pacientes con antecedente de revascularización previa al periodo de realización del presente estudio; 2 pacientes cuya muestra sanguínea no se logró procesar, por no cumplir las condiciones de extracción y almacenamiento y 1 paciente cuya muestra sanguínea no fue suficiente para la determinación proteica. Con lo cual, a continuación se describen los resultados de 83 pacientes que si cumplían los criterios de selección para su estudio, los cuales continuaron en seguimiento 30 días posteriores a la cirugía.

En el caso de las arterias mesentéricas de los pacientes de cirugía abdominal, se incluyeron 77 arterias en el periodo comprendido de enero de 2013 a diciembre de 2014, el rango de edad de los pacientes, fue de 50 a 91 años. La descripción detallada de las características clínicas observadas se encuentra en el apartado 5.2.

Del total de pacientes revascularizados de las cohorte estudiada, el 22% fueron mujeres, con un promedio de edad $66,4 \pm 11$ con rango entre 60 y 80 años de edad; la media del índice de masa corporal fue de $28,8 \pm 4,8$. Las patologías observadas fueron: dislipidemia 67%; DM tipo 2, 46%; hipertensión arterial 78%; tabaquismo activo 24%; Obesidad de acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS): pre-obesidad 47%, Obesidad grado I, 23% Obesidad grado II, 4%, y obesidad grado III, 3%. El 47% de los pacientes estudiados no tenía antecedentes de infarto previo a la cirugía de revascularización, la fracción de eyección promedio fue $53,4 \pm 13$ %. El promedio en la escala EuroSCORE de los pacientes fue de $5,2 \pm 4,7$.

La cohorte se dividió en grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos y se realizó el análisis comparativo entre variables. Destaca la diferencia estadísticamente significativa en una mayor frecuencia de dislipidemia en pacientes revascularizados con DM2 (RVnoDM2 55% vs RVDM2 82% respectivamente, $p=0,01$) y tabaquismo activo en pacientes revascularizados no diabéticos (RVnoDM2 40% vs RVDM2 13%) $p=0,02$ (Tabla 4).

	Grupo Total 83	Pacientes Revascularizados NO DM2 (n=45)	Pacientes Revascularizados DM2(n=38)	P
Edad (años)	67,4 ± 11	65,6 ± 12	67,2 ± 9	0,5215 ¶
Mujeres %	(18/83) 22%	(7/45) 15 %	(11/38) 29%	0,1402†
Hombres%	(65/83) 77%	(38/45) 84%	(27/38) 71%	
HTA %	(65/83) 78%	(33/45) 73 %	(32/38) 84%	0,2309†
Tabaquismo %				
No Fumadores	(34/83) 41%	(15/44) 34%	(19/38) 50%	0,0204‡
Fumadores	(23/83) 28%	(18/44) 40%	(5/38) 13%	
Ex Fumadores	(25/83) 30%	(11/44) 25%	(14/38) 36%	
Dislipidemia %	(56/83) 67%	(25/45) 55 %	(31/38) 82%	0,0116†
IAM %				
Sin IAM previo	(39/83) 47%	(23/44) 52%	(16/38) 42%	0,4295‡
1 a 7 días	(6/83) 7 %	(1/44) 2%	(5/38) 13%	
8 a 21 días	(17/83) 20 %	(9/44) 20%	(8/38) 21%	
22 a 90 días	(5/83) 6%	(3/44) 6%	(2/38) 5%	
> 90 días	(15/83) 18 %	(8/44) 18%	(7/38) 18%	
IMC	28.8 ± 4,8	28,9 ± 5,5	28,6 ± 3,9	0,8065¶
FE %	53.4 ± 13 %	52,6± 13 %	54,2 ± 14%	0,6023¶
EuroSCORE				
Logística	5.2± 4,7	5,4 ± 5,2	4,8 ± 4,2	0,5872¶
Aditiva	4.8±0,3	5 ± 0,5	4,7 ± 0,4	0.6955¶

Tabla 4. Características clínicas de la cohorte de pacientes revascularizados. División en grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos. ¶ = Prueba t de Student, ‡= Prueba χ^2 , †= Prueba exacta de Fisher. HTA: hipertensión arterial; IAM: infarto agudo miocárdio; IMC: índice de masa corporal; FE: fracción de eyección.

Al analizar los parámetros bioquímicos y séricos no encontramos diferencias estadísticamente significativas o fuera de los rangos considerados normales para la edad. Solo se encontraron diferencias significativas en el caso de los niveles séricos de glucosa, siendo mayores en el grupo de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (RVDM2 156,4mg/dl vs RVNoDM2 101,1 mg/dl), $p < 0,0001$ (Tabla 5). Es de destacar que algunos pacientes revascularizados con

Diabetes Mellitus tipo 2, presentaron niveles de casi 400mg/dl de glucosa.

	Grupo total	Pacientes Revascularizados NO DM2 (n=45)	Pacientes Revascularizados DM2(n=38)	P
Glucosa (mg/dl)	127,7±59	100,6 ± 23,1	159,1 ± 71,3	<0,0001 ¶
Creatinina	1,1 ± 0,5	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,8	0.3303¶
Filtrado Glomerular	70,7 ± 22,3	72,1 ± 21,2	6912 ± 23,7	0.5472¶
Leucocitos	7290± 2267	7308 ± 2231	7667 ± 2344	0,9351 ¶¶
Plaquetas (u/L)	212988 ± 7235	214133 ± 81240	211631 ± 61249	0,8735 ¶¶
Monocitos (u/L)	647.6± 228,3	645 ± 245	650 ± 210	0,9282¶¶

Tabla 5. Variables bioquímicas de la cohorte de pacientes revascularizados. División en grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos. ¶ = Prueba t de Student. ¶¶ = Prueba U de Mann-Whitney.

En cuanto al promedio de evolución de la enfermedad cardiovascular, la media fue de $38,11 \pm 69,5$ meses con un rango de 0 a 384 meses para el total de los pacientes revascularizados. Al hacer el análisis por grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos, encontramos una variación importante entre la cronicidad de cada grupo y el momento de la realización de la cirugía de revascularización (RVNoDM2 $46,1 \pm 86,8$ meses vs RVDm2 $29,6 \pm 53,4$ meses, $p=0,032$), aunque no estadísticamente significativa.

De esta forma, al sub clasificarlos en grupos de evolución (grupo 1: menos de 6 meses de evolución; grupo 2: de 6 a 12 meses; grupo 3: de 13 a 60 meses y grupo 4: más de 60 meses), tenemos una diferencia con tendencia a la significancia, $p=0,0799$. Observamos un número mayor de pacientes no diabéticos, sin antecedentes de enfermedad cardiovascular a los cuales se les ha realizado una cirugía de revascularización; y por el contrario, más pacientes diabéticos con enfermedad cardiovascular crónica, que son sometidos a revascularización (Figura 11).

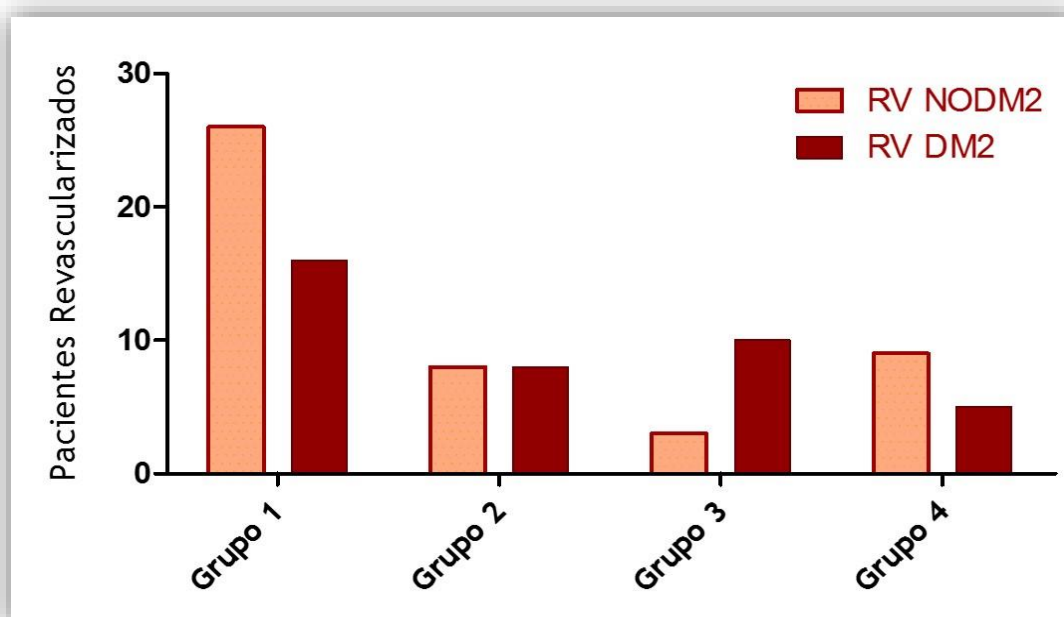


Figura 11. Grupos de evolución cardiovascular de la cohorte de pacientes revascularizados. División en grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos. Grupo 1: < de 6 meses de evolución; grupo 2: de 6 a 12 meses; grupo 3: de 13 a 60 meses y grupo 4: > de 60 meses).

En cuanto al análisis de la capacidad funcional de los pacientes de acuerdo con la clasificación de la New York Heart Association (NYHA) para la insuficiencia cardíaca congestiva, tenemos que solo el 4% (3/71) de los pacientes se encontraban en clase funcional IV (Tabla 6). Y al analizar por pacientes con o sin diabetes, encontramos mayor porcentaje de pacientes no diabéticos (72%) en clase funcional I, con tendencia a la significancia ($p=0,05$), comparados con los pacientes diabéticos (40%).

Clasificación NYHA	Grupo total	Pacientes Revascularizados NO DM2	Pacientes Revascularizados DM2	p
I	(40/71) 56%	(26/36) 72%	(14/35) 40%	0.0534 ^α
II	(17/71) 24%	(6/36) 17%	(11/35) 31 %	
III	(11/71) 15%	(3/36) 8%	(8/35) 23%	
IV	(3/71) 4%	(4/36) 3%	(2/35) 6%	

Tabla 6. Capacidad funcional (NYHA) en la cohorte de pacientes revascularizados. División en grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos. ^α Test de Pearson's. NYHA: New York Heart Association.

En cuanto al tratamiento de las patologías asociadas se refiere, en los pacientes diabéticos encontramos que, un 8% controla su enfermedad a base de dieta, un 50% utiliza algún tipo de antidiabéticos orales solos o combinados, un 39% se aplica algún tipo de insulina y solo un 3% utiliza una combinación de antidiabéticos orales e insulina.

Respecto a los pacientes con hipertensión arterial, tenemos que un 83% utilizan 2 o más fármacos y un 9 % no toman tratamiento, a pesar de saberse con la enfermedad y este porcentaje es mayor en pacientes no diabéticos (Tabla 7).

Tratamiento	Pacientes HTA	Pacientes Revascularizados NO DM2	Pacientes Revascularizados DM2	P
1 Fármaco	(5/65) 8%	(3/33) 9%	(2/32) 6%	0.2078+
2 o más	(54/65) 83%	(25/33) 76%	(29/32) 91%	
No lo usan	(6/65) 9%	(5/33) 15%	(1/32) 3%	

Tabla 7. Frecuencia de ingesta de fármacos en los pacientes hipertensos. División en grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos. +Fisher. HTA: hipertensión arterial.

En el caso de los pacientes con dislipidemia, tenemos que el 75 % toma algún tipo de hipolipemiente (estatinas en su mayoría) y un 25 % de los pacientes no toma tratamiento a pesar de conocerse con la enfermedad (Tabla 8).

Tratamiento	Pacientes Dislipidemicos	Pacientes Revascularizados NO DM2	Pacientes Revascularizados DM2	p
1 o más	(42/56) 75%	(19/25) 76%	(23/31) 74%	0,8767
Ninguno	(14/56) 25%	(6/25) 24%	(8/31) 26%	

Tabla 8. Frecuencia de ingesta de fármacos en los pacientes con dislipidemia. División en grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos. +Fisher.

Al analizar la presencia de complicaciones en la cohorte de pacientes estudiada, encontramos que las complicaciones cardiacas son las más frecuentes (20%), y al dividir en grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos tenemos mayor presencia de complicaciones cerebrovasculares (3%) y muerte (8%) en pacientes diabéticos en comparación con no diabéticos, en los cuales predominan las complicaciones cardiacas (24%) y complicaciones mixtas (15%) (Tabla 9).

Complicaciones	Cohorte total	Pacientes Revascularizados NO DM2	Pacientes Revascularizados DM2	P
Sin complicaciones	(47/83) 56%	(24/45) 53%	(23/38) 60%	0,47 54+
C. Cardiacas	(17/83) 20%	(11/45) 24%	(6/38)16%	
C. Renales	(4/83) 5%	(2/45) 4%	(2/38)5%	
C. Cerebrovasculares	(1/83) 1%	(0/45) -%	(1/38)3%	
C. Mixtas (C, R, Rp, CV)	(10/83) 12%	(7/45) 16%	(3/38)8%	
Muerte	(5/83) 5%	(1/45) 2%	(3/38)8%	

Tabla 9. Complicaciones postoperatorias presentadas en la cohorte de pacientes revascularizados. División en grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos. +Test exacto de Fisher.

4. Funcionalidad y papel de las moléculas de adhesión en pacientes ateroscleróticos diabéticos y no diabéticos sometidos a revascularización miocárdica

4.1 Niveles de SDF-1 α en plasma

Está bien descrito, que en sangre periférica es la hipoxia inducida por elevados niveles de SDF-1 α lo que moviliza a las EPCs al sitio de lesión. Debido a esto, analizamos los niveles de SDF-1 α en plasma de los pacientes sometidos a revascularización divididos en diabéticos y no diabéticos observando una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0310$) entre los grupos, ya que los niveles de SDF-1 α en los diabéticos ($4143\text{pg/ml} \pm 708,3$) son mayores que en los no diabéticos ($3542\text{pg/ml} \pm 1054$) (Figura12).

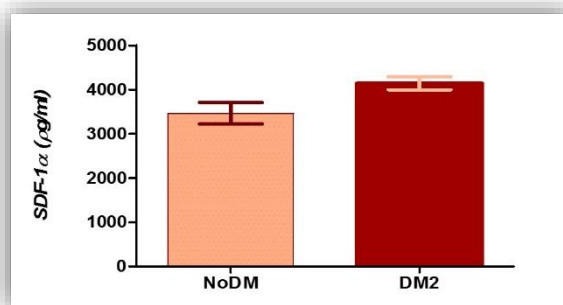


Figura 12. Niveles de SDF-1α en la cohorte de pacientes revascularizados. División en grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos. Prueba t de Student

Al analizar los niveles de SDF-1α y el antecedente de infarto previo, observamos un aumento con tendencia significativa en los pacientes con IAM previo de 1 a 7 días en los pacientes diabéticos (Figura 13).

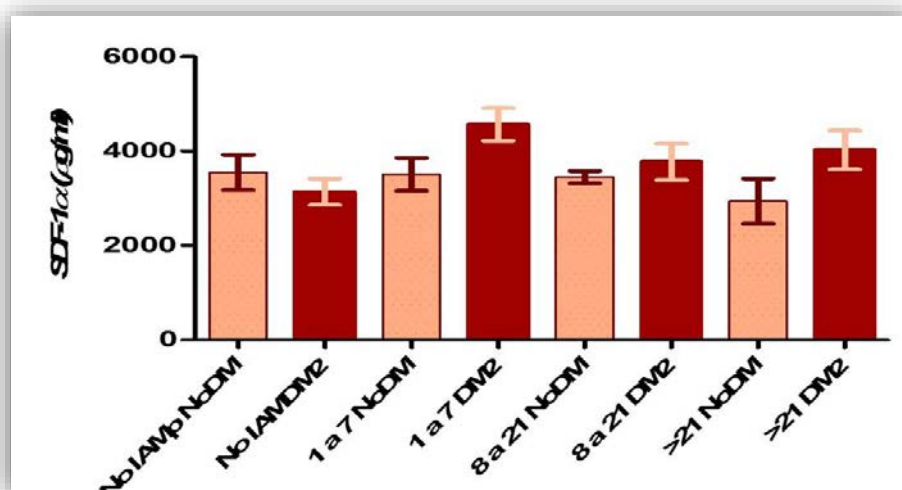


Figura 13. Niveles de SDF1α y su relación con antecedente previo de infarto. División en grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos. Prueba t de Student

Posteriormente, al realizar el análisis para determinar la contribución independiente de cada uno de los factores de riesgo estudiados, en los valores de SDF1α en los pacientes diabéticos y no diabéticos y/o revascularizados, observamos una asociación directa con la edad ($p = 0.078$) y en forma estadísticamente significativa con los niveles de HB1A ($p = 0.021$) y en forma indirecta con los niveles de HDL ($p = 0.062$), y con el uso de insulina ($p = 0.049$). (Tabla 10).

Variable	β -estimada	P	Eta ²
Edad	28.21	0.0781	4,2 %
HB1A	298.42	0.0213	8 %
HDL	-23.15	0.0619	7 %
IAI	-859.63	0.0495	7,8 %

Tabla 10. Variables asociadas en forma independiente al nivel de la expresión de SDF1, la primera columna es el valor de la β (signo y valor parcial de la regresión estimada para la variable), la segunda columna el valor de p y la tercera, Eta² (proporción de la variación de SDF1, explicada cuando las otras variables explicativas permanecen constantes). R² múltiple = 0.27: ajustada = 0.20.

El modelo de estudio ($SDF-1\alpha \sim Edad + HB1A + HDL + IAI$) (Figura 14), explica el 27 % de los niveles séricos de SDF-1 α observados y un 73% de la variabilidad del valor de SDF-1 α , es debida a otras variables no incluidas en el estudio.

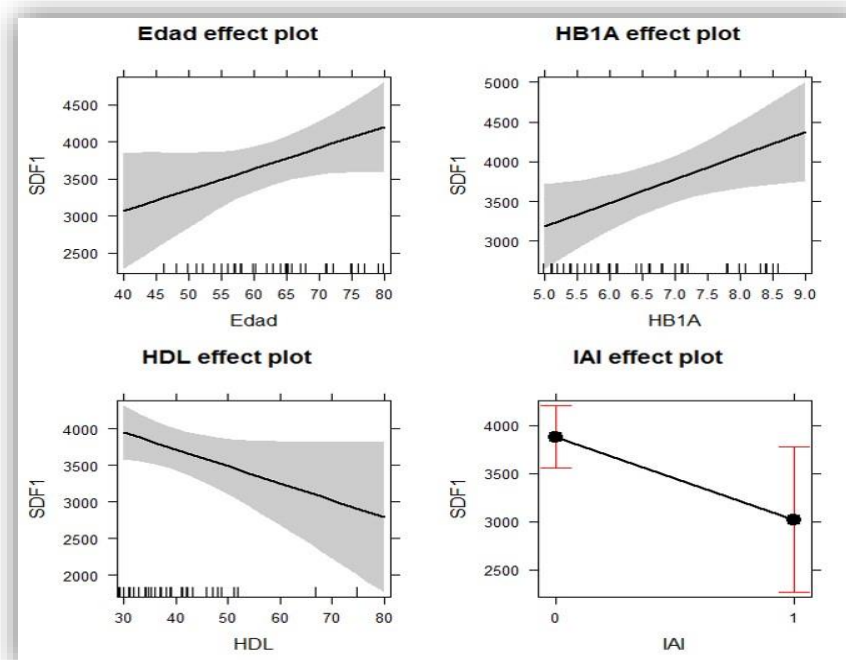


Figura 14. Graficas representativas de los valores de SDF-1 α observados en los pacientes revascularizados diabéticos y no diabéticos y el efecto de los factores de riesgo en el modelo de estudio analizado.

4.2 Alteraciones en la expresión del eje SDF1/CXCR4 en las EPCs y su relación con parámetros clínicos.

Se aislaron EPCs procedentes de sangre periférica en pacientes sometidos a revascularización miocárdica y se valoró la expresión del eje SDF1/CXCR4 y de CD105, ERG y Ets-2, mediante Western- blot. Posteriormente se dividieron por grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos y/o aterosclerosis, destacando una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de SDF1 ($p=0,0026$), al comparar el grupo de pacientes revascularizados no diabéticos ($3,2 \pm 2,3$) vs diabéticos ($1,41 \pm 1,4$) (Tabla 11).

Respecto a la expresión de CXCR4, CD105, Ets-2, ERG, no se observó una diferencia estadísticamente significativa, pero si una tendencia a una mayor expresión en los pacientes revascularizados no diabéticos (Figura 15).

	Pacientes revascularizados No DM (n=34)	Pacientes revascularizados DM2 (n=28)	P
SDF-1	$3,2 \pm 2,3$	$1,41 \pm 1,4$	$0,0026 \text{ ¶}^*$
CXCR4	$1,32 \pm 1$	$1,08 \pm 0,9$	$0,3597 \text{ f}$
CD105	$0,95 \pm 0,8$	$0,80 \pm 0,6$	$0,5005 \text{ ¶}$
Ets-2	$1,6 \pm 1,5$	$1,17 \pm 1$	$0,1055 \text{ ¶}$
ERG	$1,17 \pm 1,7$ (n=15)	$0,52 \pm 0,74$ (n=16)	$0,0418 \text{ f}^*$

Tabla 11. Niveles de expresión de SDF1, CXCR4, CD105, Ets-2, ERG en la cohorte de pacientes revascularizados. División en grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos. ¶ = Prueba t de Student, f = Prueba U de Mann Whitney. Se presenta la media y desviación estándar en unidades arbitrarias respecto a β -actina. n=62. * $p<0,05$, ** $p<0,005$

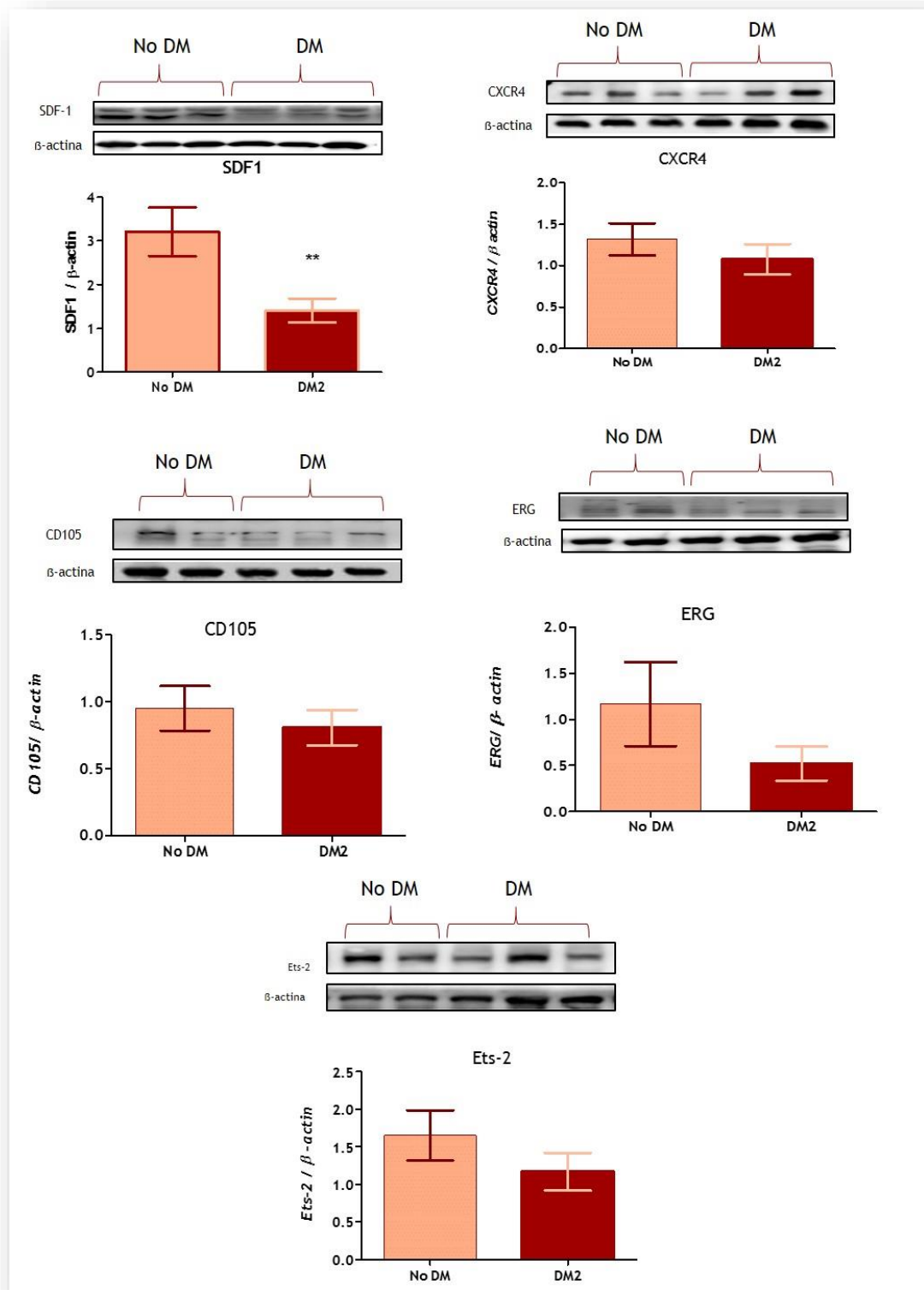


Figura 15. Gráficos representativos de la expresión de SDF1, CXCR4, CD105, ERG, Ets-2 en la cohorte de pacientes revascularizados. División en grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos y/o ateroscleróticos. Se muestra la media y desviación estándar en unidades arbitrarias respecto a β -actina. Prueba t de Student $n=62$. * $p<0.05$

Posteriormente, debido a la gran variabilidad observada, al realizar el análisis para determinar la contribución independiente de cada uno de los factores de riesgo estudiados (parámetros clínicos) en la expresión de SDF1, en los pacientes diabéticos y no diabéticos y/o revascularizados, observamos una asociación directa con tendencia a la significancia con la edad ($p = 0.09$), y de forma indirecta y en forma estadísticamente significativa con la presencia de DM2 ($p = 0.02$), el índice de masa corporal ($p = 0.04$), el tiempo de evolución de la enfermedad cardiovascular ($P = 0.003$), el número de monocitos ($p = 0.02$) y con el sexo (Mujeres, $p = 0.004$) y con el antecedente de infarto previo con tendencia a la significancia ($p = 0.06$) (Tabla 12, Figura 16).

El modelo de estudio ($SDF1 \sim \text{Sexo} + \text{Edad} + \text{DM2} + \text{IMC} + \text{Tiempo evolución} + \text{Monocitos} + \text{IAM previo}$), explica el 49% de los niveles de expresión de SDF1 observados y un 51% corresponde a variables desconocidas, no contempladas en el estudio.

Variable	B estimada	P	Eta ²
Sex (Mujer)	-1.51	0.004	12 %
Edad	0.04	0,09	3,7 %
DM2	-1,02	0.02	6.8 %
IMC	-0,07	0.04	5,8 %
Evol. ECV	-0.007	0.003	13,5 %
Monocitos	-0.002	0.02	7,3%
IAMp (1 a 7 días)	-2.065	0.06	12.8%

Tabla 12. Variables asociadas en forma independiente al nivel de la expresión de SDF1, la primera columna es el valor de la B (signo y valor parcial de la regresión estimada para la variable), la segunda columna el valor de p y la tercera, Eta2 (proporción de la variación de SDF1, explicada cuando las otras variables explicativas permanecen constantes). R2 múltiple = 0.62 ajustada = 0.49.

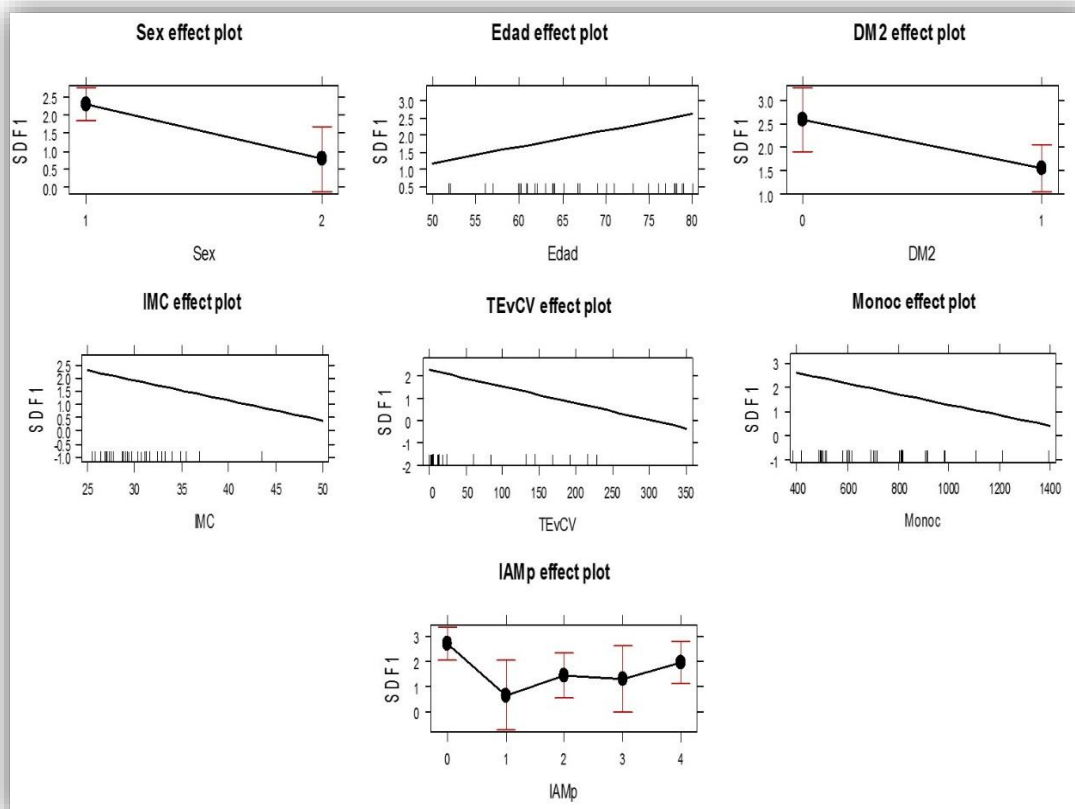


Figura 16. Graficas representativas de los valores de SDF1 observados en los pacientes diabéticos y no diabéticos revascularizados y el efecto de los factores de riesgo en el modelo de estudio analizado.

Al realizar el análisis para determinar la contribución independiente de los factores de riesgo estudiados (parámetros clínicos) y otras moléculas de adhesión (CXCR4, CD105, ERG, Ets-2), en la expresión de SDF1, observamos que el nivel de expresión se veía modificado de forma directa, pero no estadísticamente significativa por la expresión de CXCR4 ($p = 0.17$), y de forma indirecta y estadísticamente significativa, por el factor de transcripción Ets-2 ($p=0.02$) y el número de monocitos ($p = 0.002$) (Tabla 13).

De esta forma el modelo evaluado (**SDF1 ~ Sexo+ IAM previo + Monocitos + Ets-2+CXCR4**) (Figura 17), explica el 50% de los niveles de expresión de SDF1 observados en los pacientes, y el 50% restante, corresponde a variables desconocidas, no contempladas en el estudio.

Variable	B estimada	P	Eta ²
Sex (Mujer)	-1.37	0.01	13,7 %
IAMP			
De 1 a 7 días	-2.17	0.1214	14,7 %
de 8 a 21 días	-1.63		
de 22 a 90 días	-2,70		
> 90 días	-2,49		
Monocitos	-0.004	0.002	21,8 %
Ets-2	-1,36	0.02	10,7 %
CXCR4	0.38	0.17	3,5 %

Tabla 13. Variables asociadas en forma independiente al nivel de la expresión de SDF1, la primera columna es el valor de la B (signo y valor parcial de la regresión estimada para la variable), la segunda columna el valor de p y la tercera, Eta² (proporción de la variación de SDF1, explicada cuando las otras variables explicativas permanecen constantes). R² múltiple = 0.646, ajustada = 0.504.

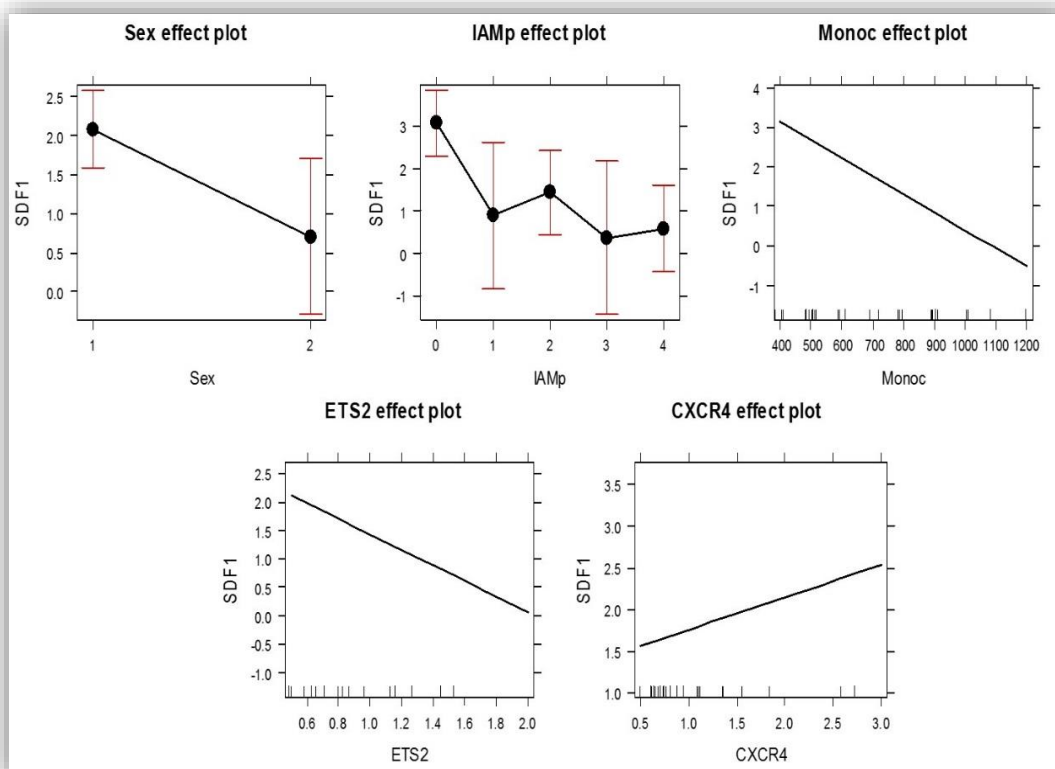


Figura 17. Graficas representativas de la contribución independiente de los factores de riesgo estudiados (parámetro clínicos) y otras moléculas de adhesión (CXCR4, Ets-2), en la expresión de SDF1 en los pacientes diabéticos y no diabéticos y/o revascularizados en el modelo de estudio analizado.

Al realizar el análisis independiente de CXCR4, para determinar la contribución independiente de los factores de riesgo estudiados (parámetros clínicos) y otras moléculas de adhesión (SDF1, CD105, ERG, Ets-2), no se logró ajustar un modelo que explicara la variación de la expresión observada. Hay una interacción directa y estadísticamente significativa con CD105 ($p = 0.01$) (Tabla 14). Así como una interacción directa con SDF1, pero no estadísticamente significativa ($p = 0.132$). Estos resultados indican que la expresión de CXCR4 en los pacientes diabéticos y no diabéticos y/o revascularizados, es explicada en un 18% por la expresión de estos factores. Y el restante 82% es por otros factores no contemplados en el estudio.

Variable	B estimada	P	Eta ²
CD105	0.61	0.01	17.8 %
SDF1	0.12	0.132	5.4 %

Tabla 14. Variables asociadas en forma independiente al nivel de la expresión de CXCR4, la primera columna es el valor de la B (signo y valor parcial de la regresión estimada para la variable), la segunda columna el valor de p y la tercera, Eta² (proporción de la variación de CXCR4, explicada cuando las otras variables explicativas permanecen constantes). R² múltiple = 0.23, ajustada = 0.18.

4.3 Efecto de los inhibidores de DPP4 en cultivos de células progenitoras endoteliales

4.3.1 Efecto proliferativo (UFC)

Para analizar el efecto de sitagliptina sobre la proliferación de las EPCs en cultivo, se verificó el efecto en la formación de colonias. Los cultivos de EPCs fueron tratados con sitagliptina a diferentes concentraciones (1, 2 y 5 μ M) y tiempos de exposición (6, 12 y 24 horas).

Se observó un aumento significativo ($p = 0,0077$) al realizar las comparaciones múltiples en la formación de colonias. En los cultivos de 1 μ M a las 6 y a las 12 horas el aumento es mayor respecto al control. En los cultivos con la misma concentración, pero a las 24hs, observamos una disminución en la formación (Figura 18). Cabe destacar que el tamaño de las colonias en los cultivos a las 12 horas es mayor respecto al control y respecto a los demás tiempos analizados.

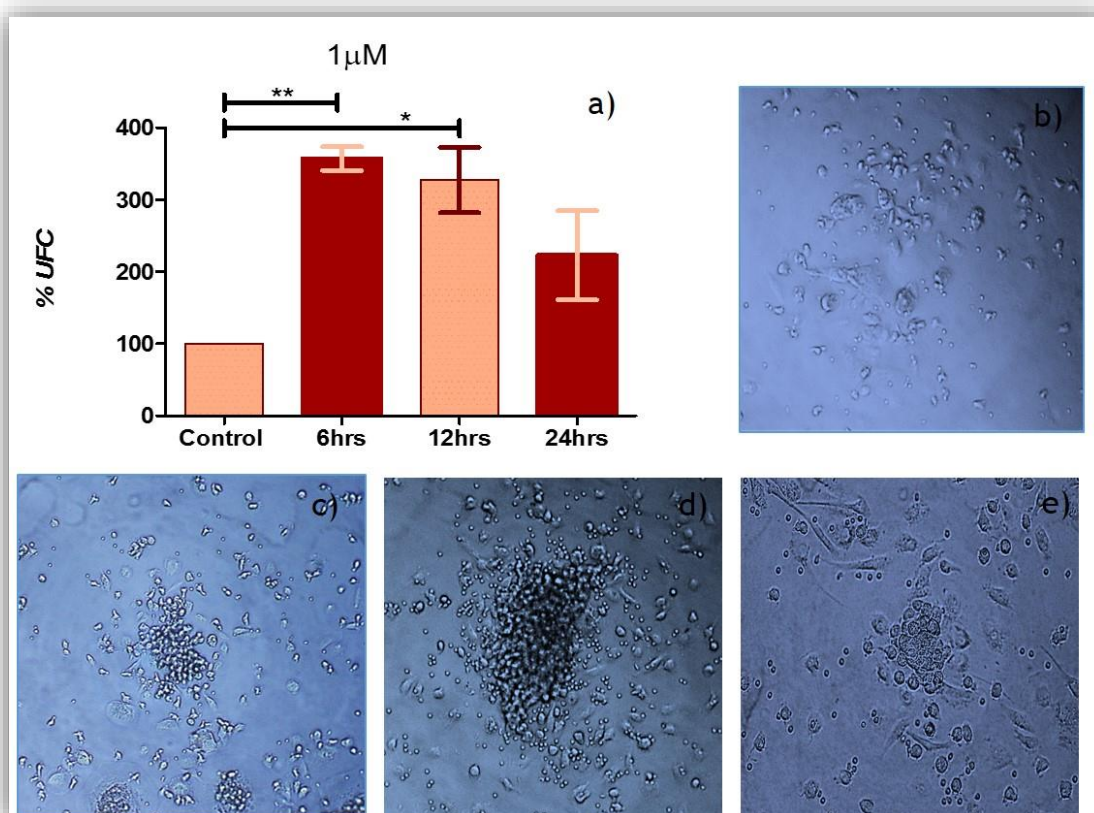


Figura 18. Efecto de sitagliptina (1 μ M) en la proliferación de cultivos de EPCs. a) Gráfico comparativo de proliferación en UFC, resultados en porcentaje respecto al control; b) cultivo control; c) cultivo 1 μ M de sitagliptina a las 6hrs de exposición; d) cultivo 1 μ M de sitagliptina a las 12hrs de exposición; e) cultivo 1 μ M de sitagliptina a las 24hrs de exposición. Las comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA, con prueba de Dunnett post-hoc. Los gráficos de barras muestran la media \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ UFC: unidades formadoras de colonias.

Al realizar el análisis comparativo del efecto de sitagliptina sobre la proliferación de las EPCs en cultivo, a una concentración de 2 μ M en los diferentes tiempos de exposición, observamos un aumento significativo en el número de unidades formadoras de colonias UFC ($p = 0,0281$). A las 6 horas el aumento es mínimo, posteriormente el número aumenta a las 12 horas (el tamaño de la colonia es mayor respecto al control), y finalmente a las 24 horas, no observamos cambios respecto al control (Figura 19).

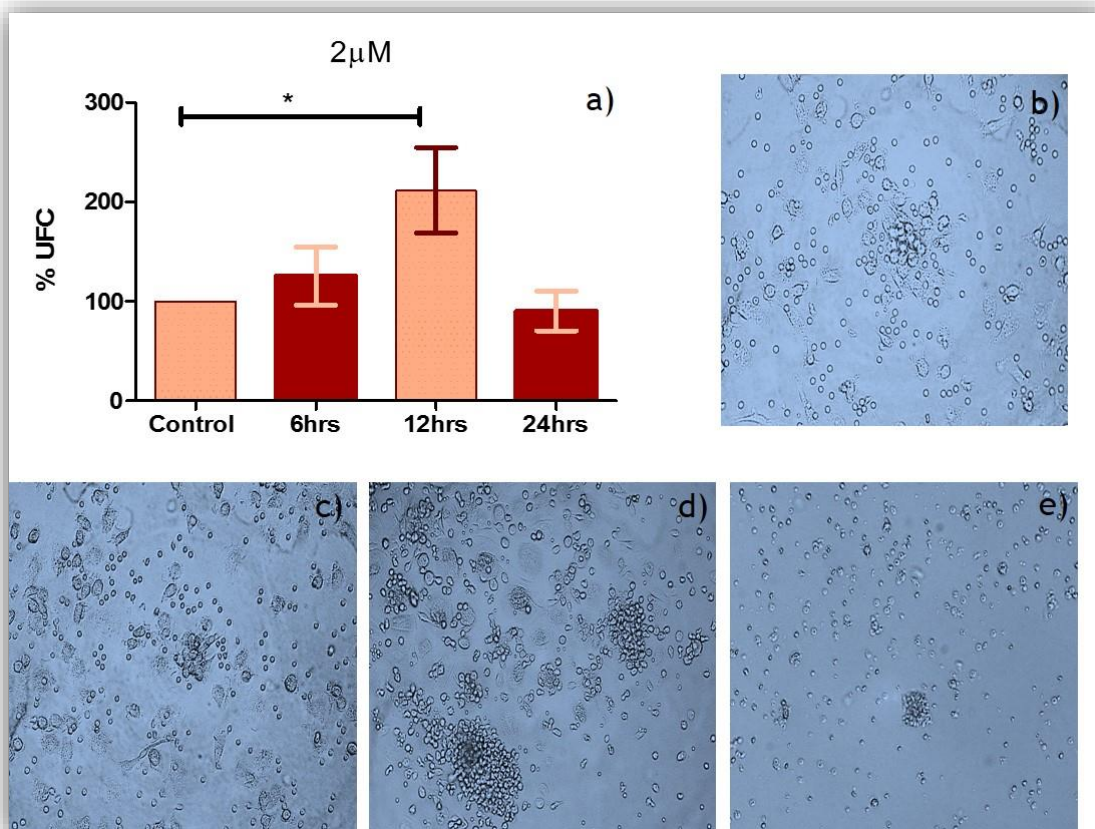


Figura 19. Efecto de sitagliptina (2µM) en la proliferación de cultivos de EPCs. a) Gráfico comparativo de proliferación en UFC, resultados en porcentaje respecto al control; b) cultivo control; c) cultivo 2µM de sitagliptina a las 6hrs de exposición; d) cultivo 2µM de sitagliptina a las 12hrs de exposición; e) cultivo 2µM de sitagliptina a las 24hrs de exposición. Las comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA, con prueba de Dunnett post-hoc. Los gráficos de barras muestran la media ± SD. UFC: unidades formadoras de colonias. * p < 0,05

En los cultivos tratados con sitagliptina 5µM, al comparar los diferentes tiempos de exposición, no observamos diferencias estadísticamente significativa ($p = 0,1415$), si hay un aumento en el número de UFC a las 6 horas de exposición, pero posteriormente el número disminuye a las 12 horas y finalmente a las 24 horas el número tiende a aumentar, pero sin haber diferencias respecto al control (Figura 20). El tamaño de las colonias fue mayor en los cultivos a las 6 horas de exposición y disminuyo de forma gradual en los demás tiempos analizados.

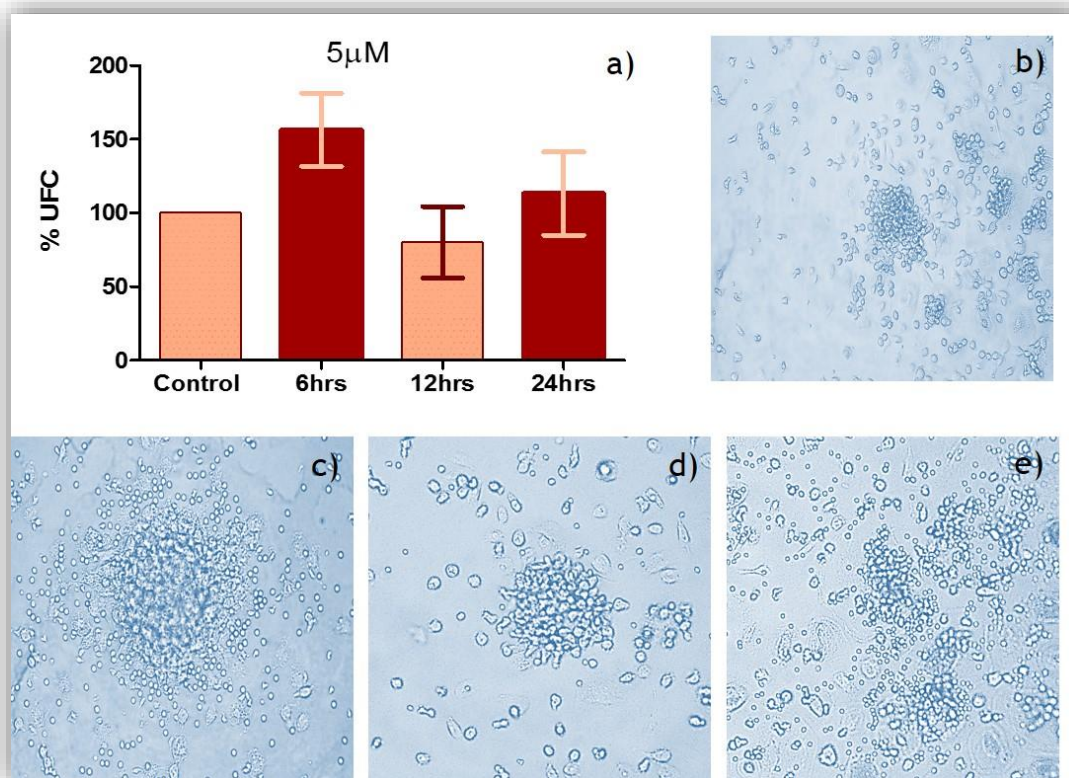


Figura 20. Efecto de sitagliptina (2µM) en la proliferación de cultivos de EPCs. a) Gráfico comparativo de proliferación en UFC, resultados en porcentaje respecto al control; b) cultivo control; c) cultivo 2µM de sitagliptina a las 6hrs de exposición; d) cultivo 2µM de sitagliptina a las 12hrs de exposición; e) cultivo 2µM de sitagliptina a las 24hrs de exposición. Las comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA, con prueba de Dunnett post-hoc. Los gráficos de barras muestran la media \pm SD. UFC: unidades formadoras de colonias.

4.3.2 Efecto en la expresión de SDF1

Al analizar el efecto de sitagliptina 1 µM en la expresión de SDF1 en cultivos de EPCs en los diferentes tiempos de exposición, observamos un efecto bifásico significativo (0,0085). Un aumento inicial de la expresión a las 6 horas de tratamiento ($1,60 \pm 0,68$ vs control $0,762 \pm 0,17$), posteriormente una disminución a las 12 horas ($1,50 \pm 0,34$) y finalmente un nuevo aumento significativo a las 24 horas ($1,85 \pm 0,63$) (Figura 21).

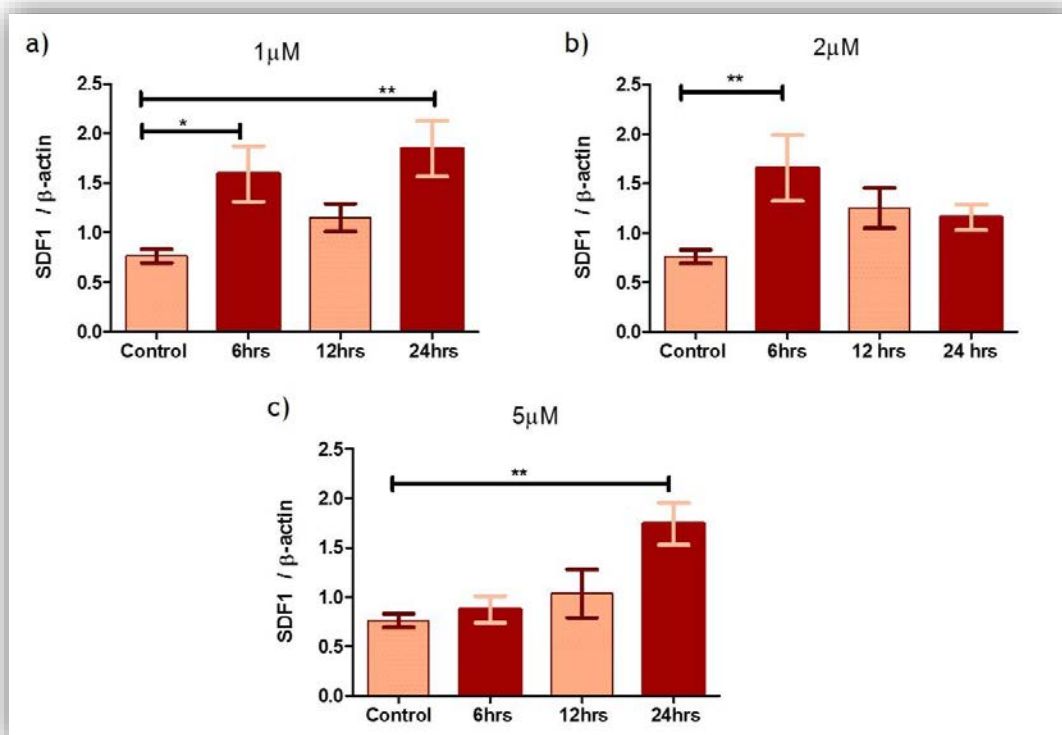


Figura 21. Gráficos comparativos de la expresión de SDF1 en cultivos con sitagliptina. En a) 1μM; b) 2μM y c) 5μM, a las 6, 12 y 24 horas de exposición. La comparación múltiple se analizó con ANOVA, con prueba de Dunnett post-hoc. Los gráficos de barras muestran la media \pm SD, n= 9. * p <0,05, ** p <0,005.

En los cultivos con 2μM de sitagliptina, observamos un aumento significativo ($p = 0,0222$), al realizar las comparaciones múltiples con los diferentes tiempos. A las 6 horas observamos un aumento inicial en la expresión de SDF1 ($1,66 \pm 0,74$ vs control $0,80 \pm 0,14$) a las 6 horas y finalmente la expresión disminuye a las 12 ($1,25 \pm 0,45$) y 24 horas ($1,16 \pm 0,29$).

Posteriormente, con la concentración de 5μM de sitagliptina, observamos un aumento significativo ($p = 0,007$) y gradual de la expresión de SDF1. A las 6 horas similar al control ($0,874 \pm 0,31$ vs control $0,805 \pm 0,150$), un discreto aumento a las 12 horas ($1,03 \pm 0,54$) y una mayor expresión a las 24 horas de exposición ($1,74 \pm 0,47$).

4.3.3 Efecto en la expresión de CXCR4

En el caso de la expresión de CXCR4, al realizar el análisis comparativo con la concentración 1 μ M, observamos un aumento gradual significativo ($p=0,0201$), en los tiempos de exposición analizados. Inicialmente observamos una moderada disminución de la expresión a las 6h ($0,723 \pm 0,44$ vs control $0,997 \pm 0,21$) y 12 horas ($0,846 \pm 0,67$), pero ésta aumenta de forma significativa a las 24 horas ($2,143 \pm 1,05$) (Figura 22). El aumento es similar al observado con la expresión de SDF1 a la misma concentración y tiempo de exposición.

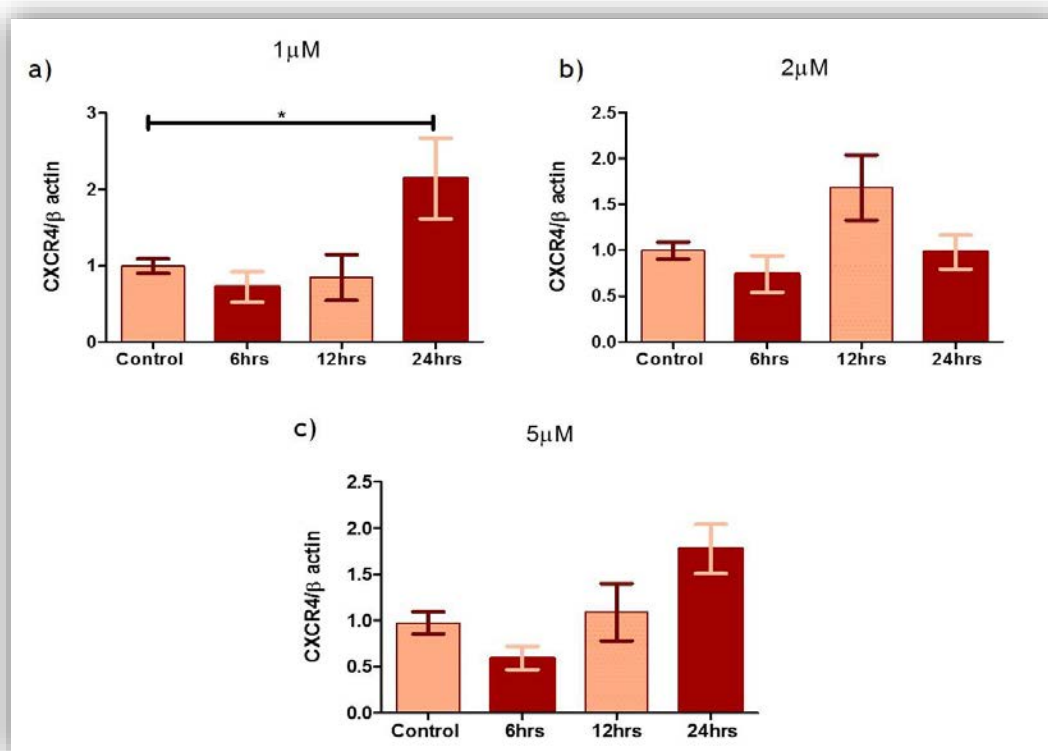


Figura 22. Gráficos comparativos del efecto de sitagliptina en la expresión de CXCR4 en cultivos de EPCs: en a) 1 μ M; b) 2 μ M y c) 5 μ M, a las 6, 12 y 24 horas de exposición. La comparación múltiple se analizó con ANOVA, con prueba de Dunnett post-hoc. Los gráficos de barras muestran la media \pm SD, $n=7$. * $p < 0,05$.

En el análisis comparativo de los cultivos de EPCs con 2 μ M de sitagliptina ($p=0,0577$), observamos una disminución inicial en la expresión de CXCR4 a las 6 horas de tratamiento ($0,742 \pm 0,44$ vs control $0,970 \pm 0,23$).

Posteriormente un aumento predominante a las 12 horas de exposición ($1,683 \pm 0,71$), y finalmente a las 24 horas no observamos diferencias en la

expresión de CXCR4 respecto al control ($0,979 \pm 0,40$), pero si un disminución respecto a la expresión observada previamente (12 horas).

Al analizar los cultivos de EPCs con $5\mu\text{M}$ de sitagliptina, observamos una disminución inicial similar a los resultados observados previamente con las concentraciones de 1 y $2\mu\text{M}$ ($0,593 \pm 0,28$ vs control $0,974 \pm 0,23$) a las 6 horas de exposición. Posteriormente la expresión permanece casi sin cambios a las 12 horas ($1,10 \pm 0,69$) y finalmente a las 24 horas, observamos un aumento en la expresión de CXCR4 ($1,775 \pm 0,52$, $p = 0,0212$).

4.3.4 Efecto en la expresión de Ets-2

Además se exploró el efecto de sitagliptina en el factor de transcripción Ets-2 en los cultivos de EPCs, debido al efecto modulador en el receptor CXCR4. No se observaron cambios significativos al realizar las comparaciones múltiples con la concentración de $1\mu\text{M}$ ($p = 0,9827$), en los diferentes tiempos de exposición (6 horas: $0,692 \pm 0,25$; 12 horas: $0,738 \pm 0,04$; 24 horas: $0,679 \pm 0,16$ vs control $0,696 \pm 0,22$) (Figura 23).

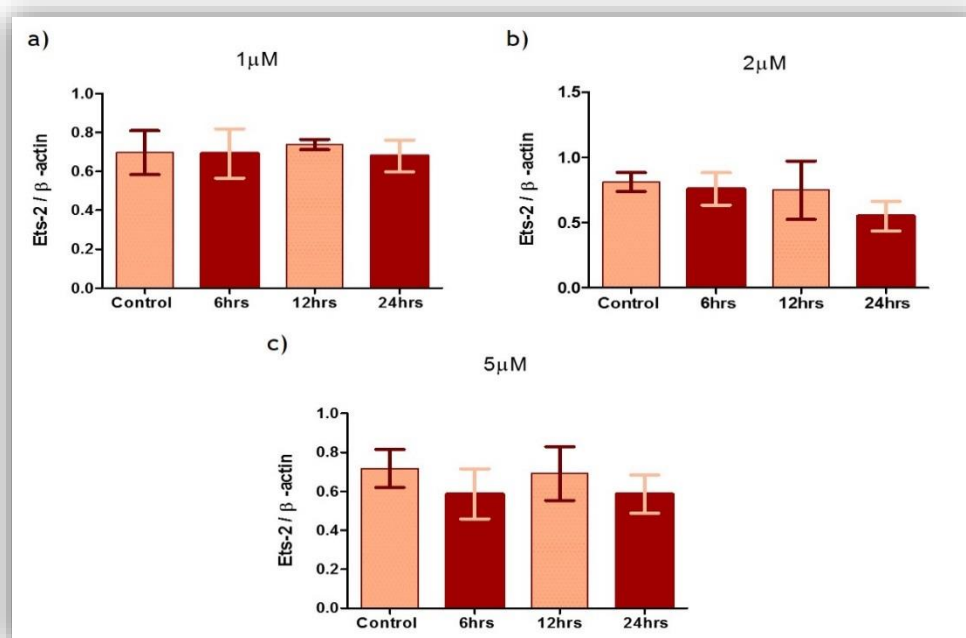


Figura 23. Gráficos comparativos del efecto de sitagliptina en la expresión de Ets-2 en cultivos de EPCs. En a) $1\mu\text{M}$; b) $2\mu\text{M}$ y c) $5\mu\text{M}$, a las 6, 12 y 24 horas. La expresión se analizó con ANOVA, con prueba de Dunnett post-hoc. Se muestra la media \pm SD, n=4.

Sin embargo en los cultivos de EPCs con concentraciones de $2\mu\text{M}$ de sitagliptina, no observamos cambios significativos de la expresión de Ets-2 a las 6 horas ($0,758 \pm 0,25$) y 12 horas: ($0,748 \pm 0,38$), pero si una disminución a las 24 horas ($0,549 \pm 0,22$) respecto al control ($0,810 \pm 0,14$), pero no estadísticamente significativo.

Finalmente, en los cultivos con $5\mu\text{M}$ de sitagliptina observamos una tendencia progresiva a la disminución de la expresión (efecto no significativo), con los diferentes tiempos de exposición analizados (6 horas: $0,587 \pm 0,25$; 12 horas: $0,691 \pm 0,27$; 24 horas: $0,586 \pm 0,19$), respecto al control ($0,718 \pm 0,19$).

4.3.5 Efecto en la expresión de SDF-1 α

Analizamos los niveles de SDF1 α en el sobrenadante de los cultivos de EPCs tratados con $1\mu\text{M}$ de sitagliptina y, al realizar el análisis comparativo, observamos un aumento significativo ($p= 0,0345$) con el mayor tiempo de exposición a sitagliptina (24hrs: $10,50 \pm 3,5\text{ng/mL}$), respecto al control ($7,60 \pm 0,9\text{ ng/mL}$) (Figura 24).

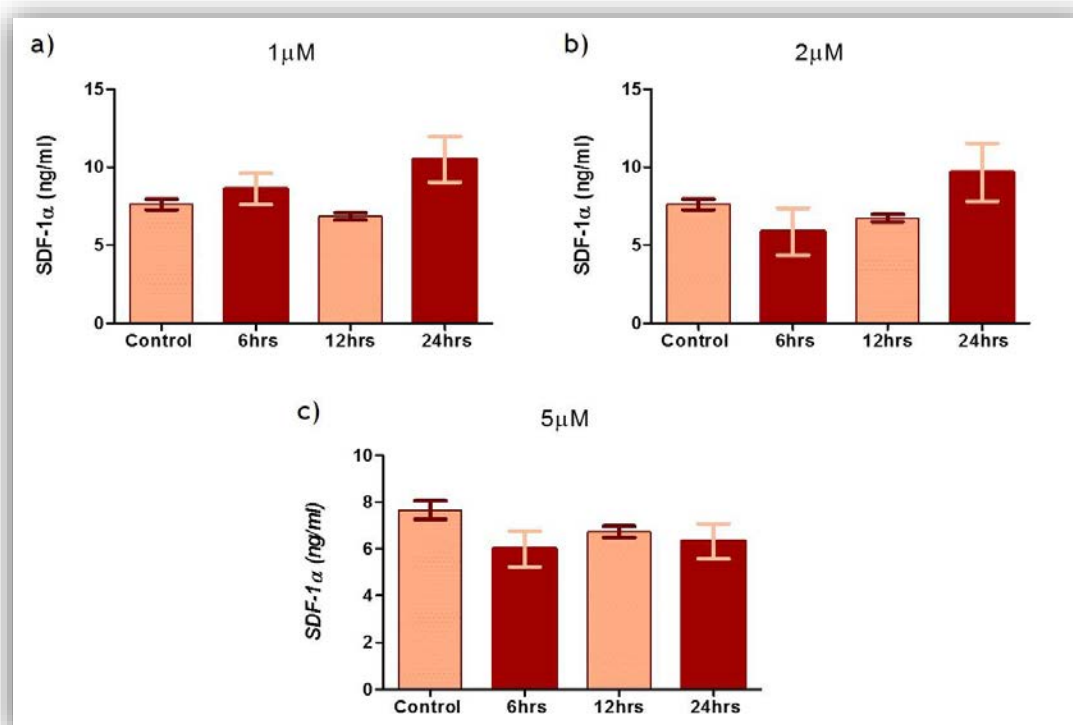


Figura 24. Gráficos comparativos del efecto de sitagliptina en los niveles de SDF-1 alfa en cultivos de EPCs. En a) $1\mu\text{M}$; b) $2\mu\text{M}$ y c) $5\mu\text{M}$, a las 6, 12 y 24 horas. La expresión se analizó con ANOVA, con prueba de Dunnett post-hoc. Se muestra la media \pm SD, $n=6$.

A las 6 horas ($8,60 \pm 1,7\text{ng/mL}$), el aumento es muy discreto y posteriormente observamos una disminución a las 12 horas ($6,80 \pm 0,6\text{ng/mL}$).

En los cultivos con $2\mu\text{M}$ de sitagliptina, observamos una disminución de los niveles de SDF1 α a las 6 horas ($5,9 \pm 2,6\text{ng/mL}$) de exposición, efecto q se mantiene sin cambios a las 12 horas ($6,7 \pm 0,6\text{ng/mL}$) y posteriormente, observamos un aumento (NS) a las 24 horas ($9,7 \pm 4,9\text{ng/mL}$) respecto al control ($7,61 \pm 0,9 \text{ ng/mL}$).

Finalmente, en los cultivos de EPCs con $5\mu\text{M}$ de sitagliptina, no observamos cambios significativos en los niveles de SDF1 α en los tiempos de exposición analizados (6 horas: $6,0 \pm 1,3$; 12horas: $6,7 \pm 0,6$; 24horas: $6,3 \pm 2,2\text{ng/mL}$) respecto al control ($7,6 \pm 1,2\text{ng/mL}$).

4.3.6 Efecto en la expresión de p53

Se estudió el efecto de sitagliptina sobre la expresión de p53, para determinar alteraciones en el ciclo celular de las EPCs. No observamos diferencias significativas en las concentraciones de 1 y 2 μM en los diferentes tiempos de exposición (Figura 25). En el caso de la concentración con $5\mu\text{M}$ de sitagliptina, observamos un aumento significativo de la expresión a las 24 horas de exposición.

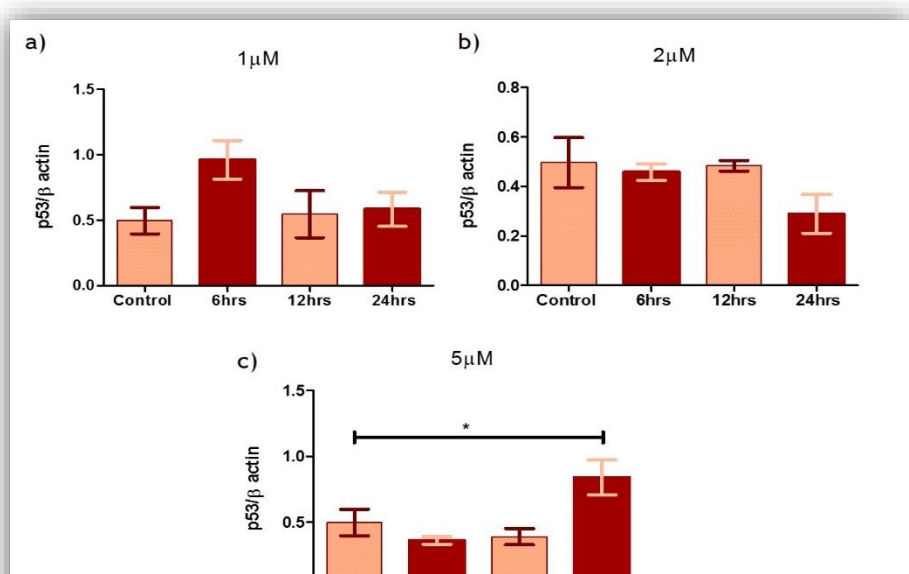


Figura 25. Gráficos comparativos del efecto de sitagliptina en los niveles de p53 en cultivos de EPCs. En a) $1\mu\text{M}$; b) $2\mu\text{M}$ y c) $5\mu\text{M}$, a las 6, 12 y 24 horas. La expresión se analizó con ANOVA, con prueba de Dunnett post-hoc. Se muestra la media \pm SD, $n=6$.

4.4. Estudio de adhesión de las células progenitoras endoteliales y su funcionalidad en arterias humanas desendotelizadas

Las arterias más frecuentemente empleadas para las cirugías de revascularización fueron: para el primer vaso ocluido, la arteria mamaria izquierda (84% RV No DM vs 89% RV DM2); segundo vaso: la safena o mamaria izquierda (53% RV No DM vs 60% RV DM2)) y para el tercer vaso: la safena o la mamaria derecha (31% RV No DM vs 36% RV DM2).

4.4.1. Estudio histomorfométrico

Las células progenitoras circulantes se han identificado como fuente de células que podrían contribuir a la hiperplasia de la neoíntima después de la lesión endotelial, por lo tanto para determinar la interacción entre la lesión del vaso (hiperplasia neointimal) y el eje SDF1/CXCR4, se realizó la caracterización (estudio histomorfométrico) de las arterias mamarias de los pacientes revascularizados diabéticos y no diabéticos y/o ateroscleróticos. Se determinaron las medidas iniciales: área incluida dentro de la lámina elástica externa (LEE); área delimitada por la lámina elástica interna (LEI); área ocupada por la luz de la arteria (AL), para poder obtener el área de la túnica media (ATM); área de la neoíntima (AN); porcentaje de reestenosis por área (% RA) y la relación AN/LEE, se observó una diferencia en casi todos los valores estudiados, no obstante sin ser estadísticamente significativos (Tabla 15). Destaca el ATM, la cual es mayor en los pacientes diabéticos, así como en el porcentaje de estenosis por área (Figura 26).

	Pacientes RV No DM	Pacientes RV DM2	P
LEE	732,2± 314,8	851,3 ± 351,8	0,5367
LEI	381,0 ± 214,8	396,5 ± 185,2	0,8916
AL	324,8 ± 193,7	304,7± 170,1	0,8455
ATM	309,9 ± 67,8	454,8 ± 214,1	0,1390
AN	56,25 ± 25,96	91,80± 93,39	0,3883
% RA	15,92± 6.8	24.33± 18.4	0,2806
Índice An/LEE	0.07 ± 0.01	0.1 ± 0.05	0,3560

Tabla 15. Comparativo de los valores obtenido en el estudio histomorfométrico de las arterias de los pacientes revascularizados, diabéticos y no diabéticos. LEE: área incluida dentro de la lámina elástica externa; LEI: área delimitada por la lámina elástica interna; AL: área ocupada por la luz de la arteria; ATM: área de la túnica media; AN: área de la neoíntima; ATM: área de la túnica media; AN: área de la neoíntima; %RA: porcentaje de reestenosis por área. N= 8 por grupo.

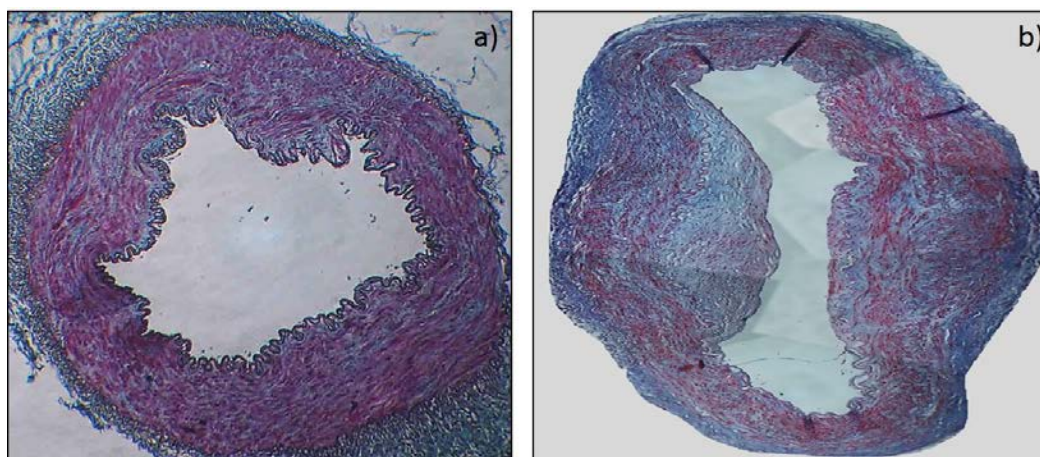


Figura 26. Comparativo de las Arterias mamarias internas de los pacientes revascularizados. En a) no diabéticos; en b) diabéticos. Tinción con hematoxilina-VOF. Cortes a 20x.

4.4.2 Estudio inmunohistoquímico. Expresión del eje SDF1/CXCR4, en las arterias de los pacientes revascularizados diabéticos y no diabéticos y/o ateroscleróticos

Para evaluar la expresión de SDF1 y CXCR4, se estudiaron segmentos de arterias mamarias internas (n=16), de los pacientes revascularizados. Se agruparon según antecedente de ausencia o presencia de infarto previo (1 a 7 días; 8 a 21 días; > 90 días). Se observó una expresión mayor de SDF1 en aquellos pacientes con antecedentes de infarto previo en los últimos 7 días, diferencia que fue estadísticamente significativa ($p= 0,0036$) al compararlo con el grupo de pacientes sin antecedentes de infarto previo. En los grupos de pacientes con antecedente de infarto de 8 a 21 días y más de 90 días, se observó una expresión mucho menor y focalizada en algunas zonas sub endoteliales (Figura 27).

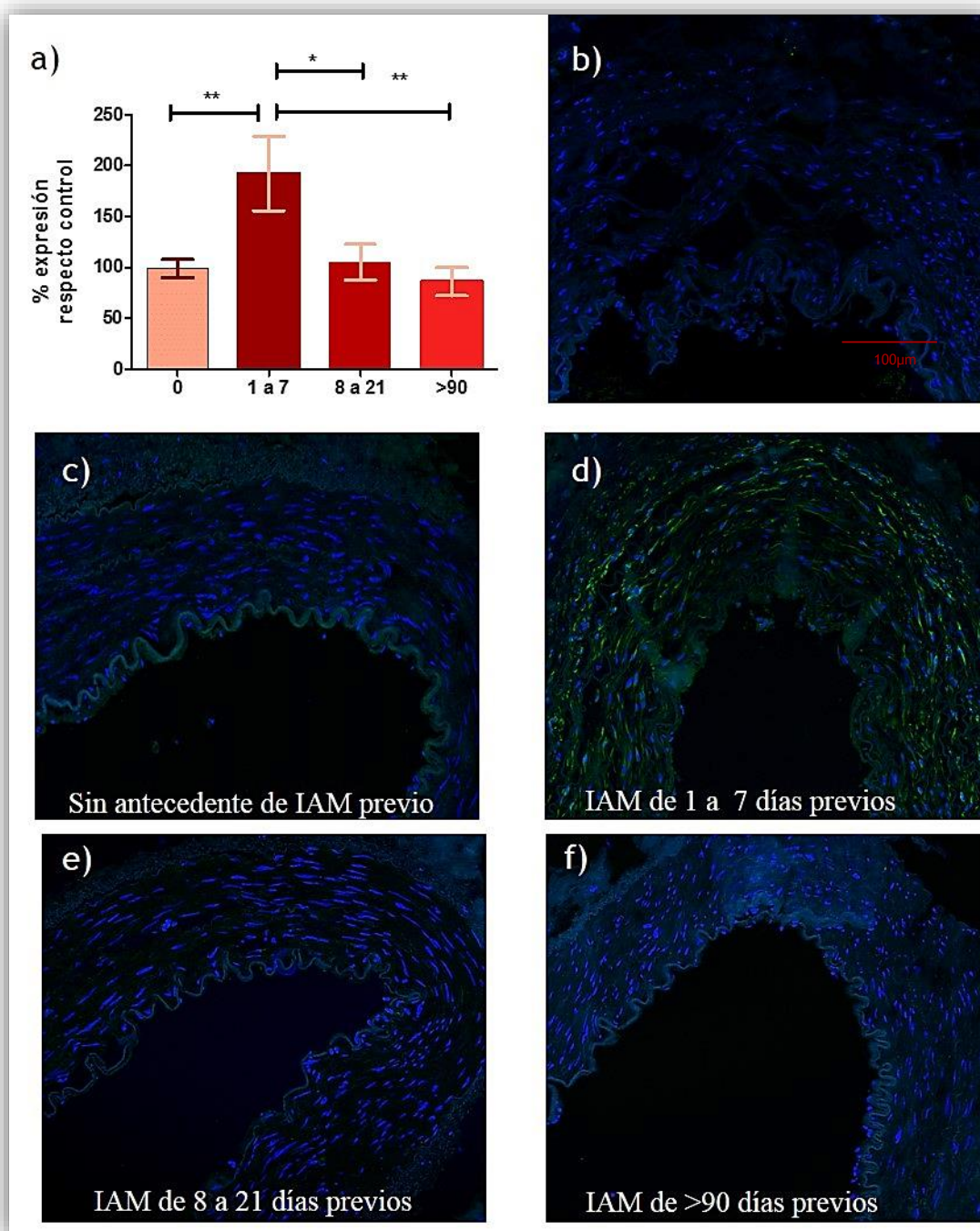


Figura 27. Expresión de SDF1 en arterias de pacientes revascularizados, evolución en tiempo. En a) gráfico comparativo de la expresión de SDF1; b) arteria control sin anticuerpo; c) arteria de paciente sin antecedentes de infarto; d) arteria de paciente con infarto previo de 1 a 7 días; e) arteria de paciente con infarto previo de 8 a 21 días; f) arteria de paciente con infarto previo mayor a 90 días. Cortes 40x. Las comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA, con prueba de Bonferroni post-hoc. Los gráficos de barras muestran la media \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$. N=16

Posteriormente se observaron diferencias con tendencia significativa al comparar la expresión de SDF1 en el grupo de pacientes diabéticos y no diabéticos. Destacando la expresión en la zona de hiperplasia endotelial, que en el caso de los pacientes diabéticos es mayor que en el caso de los pacientes no diabéticos (Figura 28).

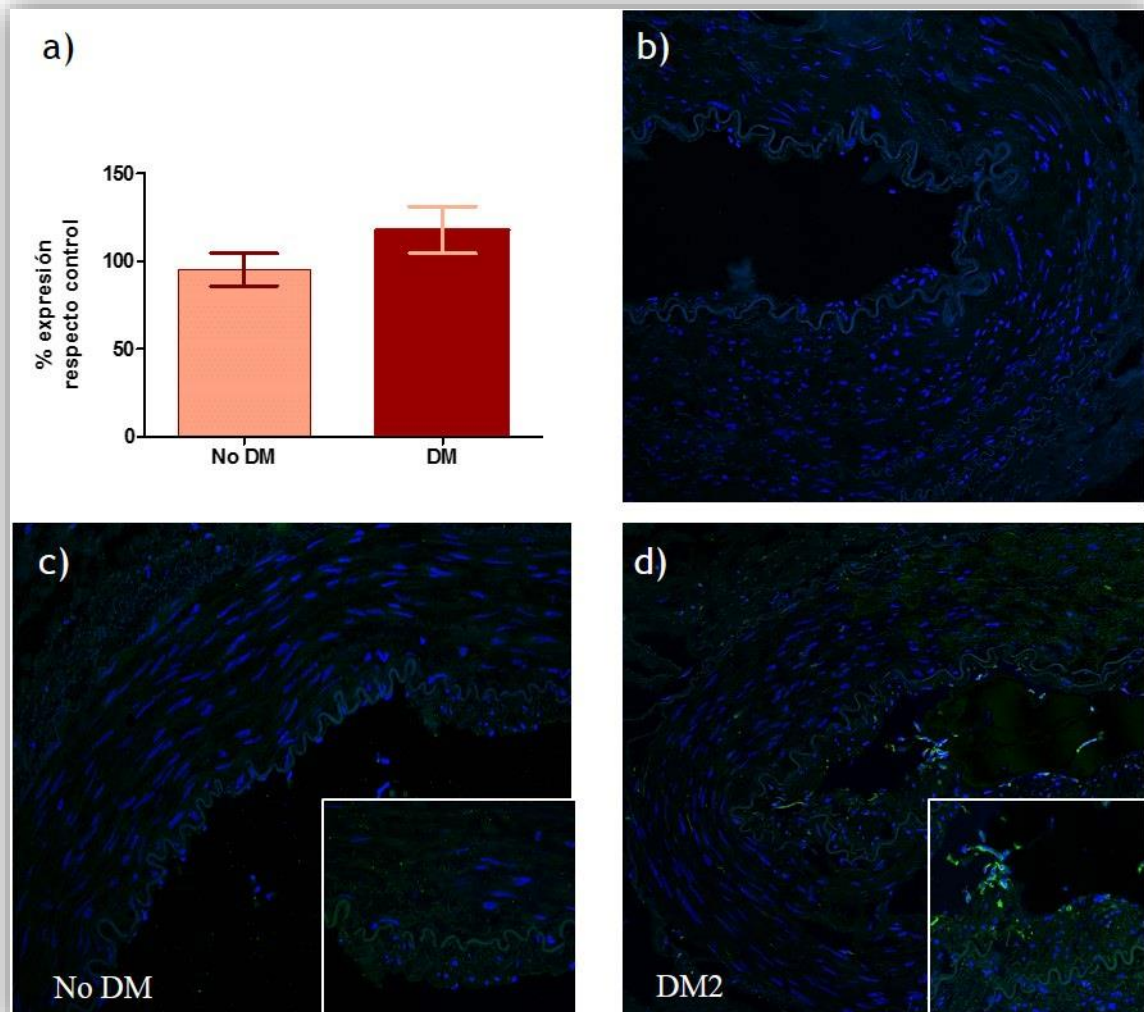


Figura 28. Expresión de SDF1 en arterias de pacientes revascularizados, división en diabéticos y no diabéticos. En a) gráfico comparativo de la expresión de SDF1; b) arteria control sin anticuerpo; c) arteria de paciente no diabéticos; d) arteria de paciente diabético. Cortes 40x, en c) y d) con aumento a 60x. Los gráficos de barras muestran la media \pm SD. Prueba t de Student, $p = 0,1830$. $N = 14$

Al realizar el análisis comparativo de la expresión de CXCR4 en los grupos, observamos una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,0111$). Siendo mayor en el grupo de pacientes con antecedente de infarto previo de 8 a 21 días antes de la cirugía de revascularización. Hay una menor expresión en los grupos de más de 90 días y de 1 a 7 días de evolución (Figura 29).

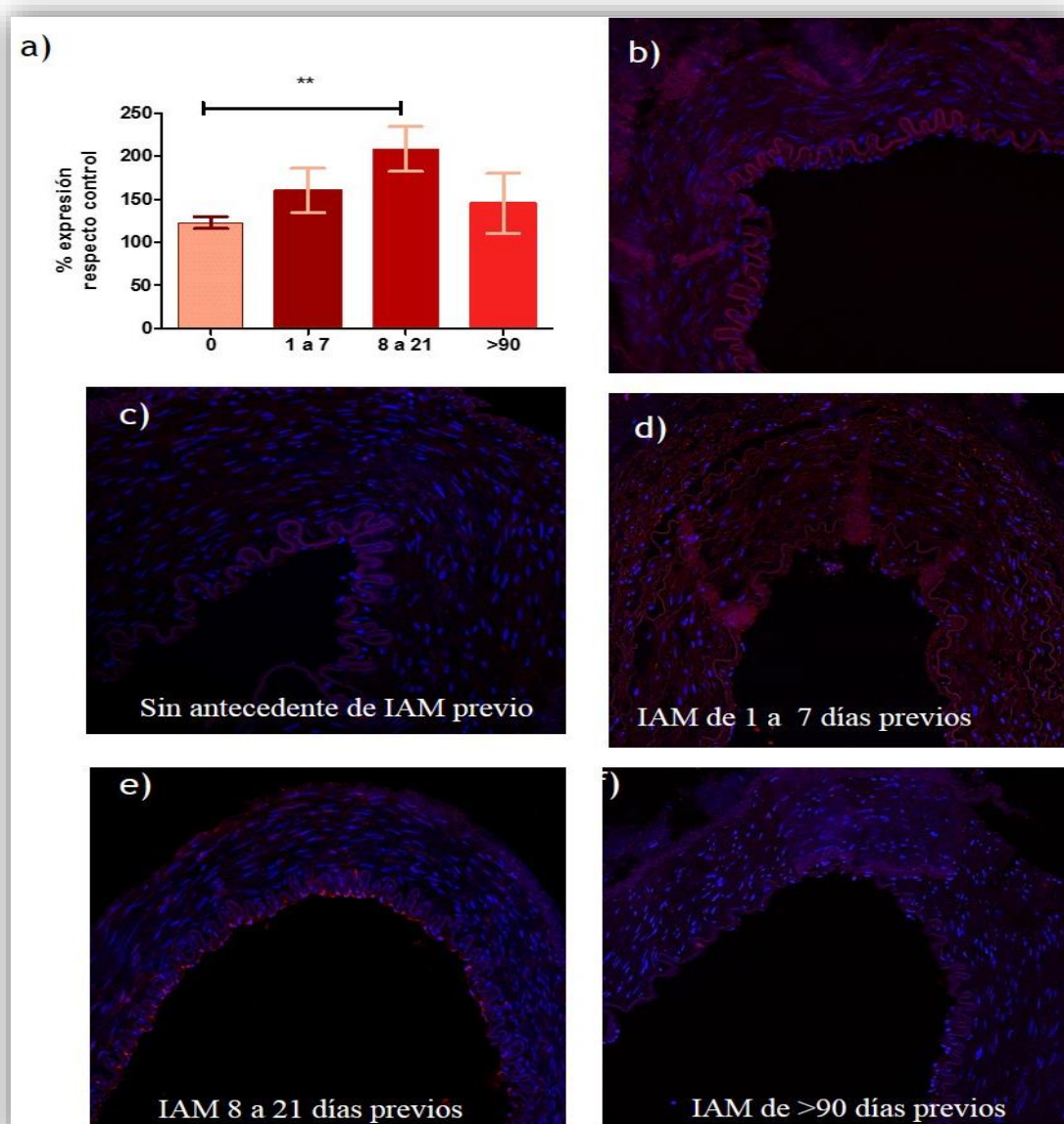


Figura 29. Expresión de CXCR4 en arterias de pacientes revascularizados, evolución en tiempo. En a) gráfico comparativo de la expresión de CXCR4; b) arteria control sin anticuerpo; c) arteria de paciente sin antecedentes de infarto; d) arteria de paciente con infarto previo de 1 a 7 días; e) arteria de paciente con infarto previo de 8 a 21 días; f) arteria de paciente con infarto previo mayor a 90 días. Cortes 40x. Las comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA, con prueba de Bonferroni post-hoc. Los gráficos de barras muestran la media \pm SD. * $p < 0,05$, ** $N=16$

Al realizar el análisis por grupo de pacientes diabéticos y no diabéticos, no observamos diferencias significativas ($p=0,7775$). Destaca una mayor

intensidad en la expresión de CXCR4 en la zona endotelial, en zona de hiperplasia, y se ve una distribución parcial a lo largo de toda la capa media de la arteria (Figura 30).

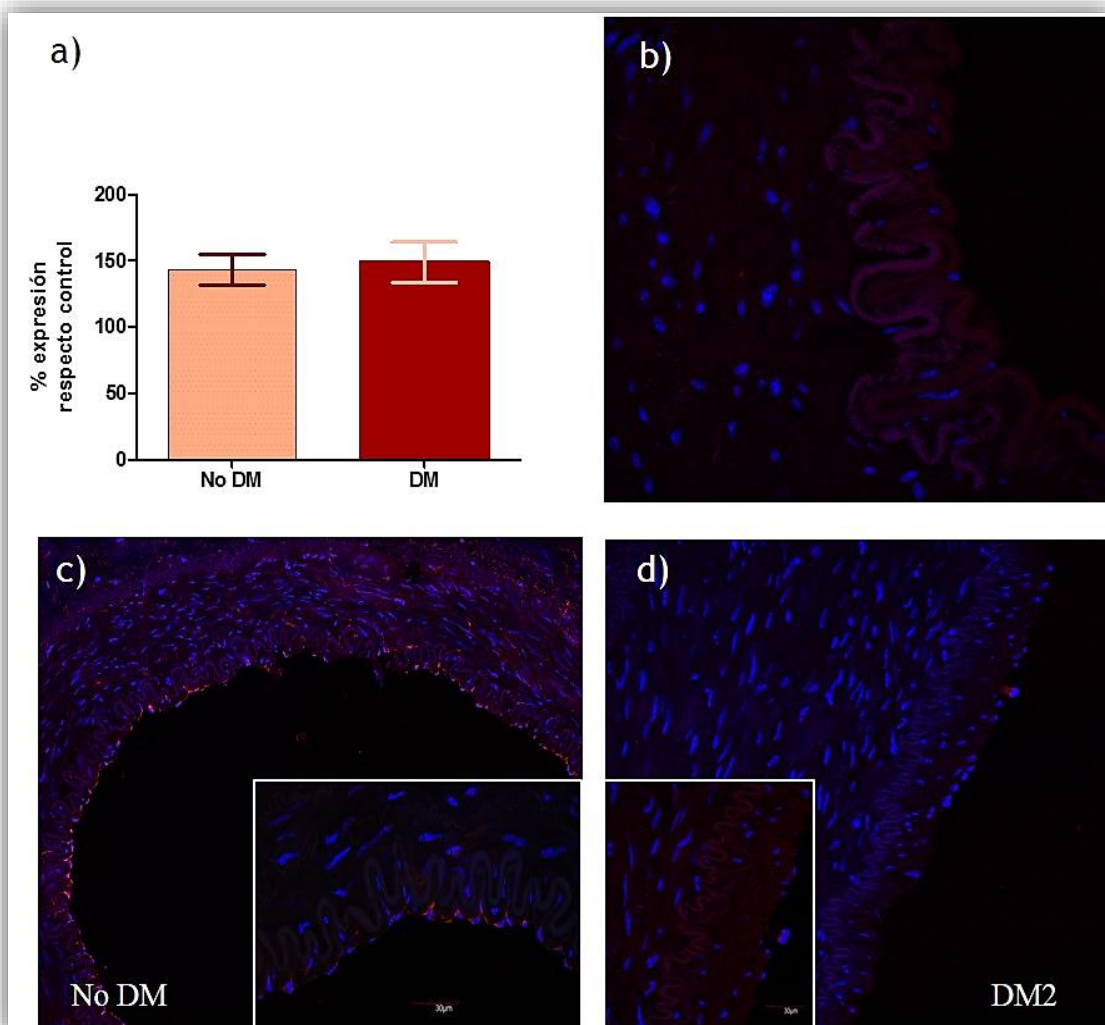


Figura 30. Expresión de CXCR4 en arterias de pacientes revascularizados, división en diabéticos y no diabéticos. En a) gráfico comparativo de la expresión de CXCR4 por grupos; b) arteria control sin anticuerpo; c) arteria de paciente no diabéticos; d) arteria de paciente diabético. Cortes 40x, en c) y d) con aumento a 60x. Los gráficos de barras muestran la media \pm SD. Prueba t de Student. N=14

4.4.3 Efecto sobre la reactividad vascular, de las células progenitoras endoteliales en arterias humanas, en un modelo “ex vivo” de adhesión por flujo

Para evaluar el efecto de las EPCs en la reactividad vascular se utilizó el modelo de adhesión por flujo (ver material y métodos). Debido al tamaño y grosor de las arterias mamarias de los pacientes revascularizados, se realizaron los experimentos con arteria mesentéricas de pacientes sometidos a cirugía abdominal, cuyo diámetro fue de $1052 \pm 581,5\mu\text{m}$.

La puesta a punto del método se realizó con 77 arterias abdominales de pacientes cuya edad media fue 71,6 años (rango de 50 a 91 años). En el 40 % de los casos, fueron mujeres. En el 56,6 % fueron hipertensos, el 43 % presentaron hipercolesterolemia, 29 % fueron diabéticos, 16% refirieron tabaquismo activo y el 20 % fueron pacientes sin antecedentes de neoplasia. (Tabla 16).

	Hombres	Mujeres	p
Edad	$72,7 \pm 11,9$	$70,1 \pm 9,3$	0,3114 ¶
DM2	(14/22) 63%	(8/22) 36%	0,6114 [‡]
HTA	(25/43) 58%	(18/43) 42%	0,8283 [‡]
HCL	(24/41) 58%	(17/41) 41%	0,9424 [‡]
Neoplasia	(34/60) 57%	(26/60) 43%	0,5212 [‡]
Obesidad	(19/32) 59%	(13/32) 41%	0,8252 [‡]
Sedentarismo	(19/31) 61%	(12/31) 39%	0,7052 [‡]
Tabaquismo			
No	(28/53) 53%	(25/53) 47%	0,4529 [‡]
Si	(8/12) 67%	(4/12) 33%	
Ex	(6/8) 75%	(2/8) 25%	

Tabla 16. Características clínicas descriptivas de los pacientes sometidos a cirugía abdominal. ¶ = Prueba t de Student, [‡]= Prueba exacta de Fisher. HTA: hipertensión arterial; HCL: hipercolesterolemia. N=77

Previo a la realización se los experimentos de reactividad, se estandarizó la concentración de los vasoconstrictores (Noradrenalina) y vasodilatadores (Acetilcolina), como se muestra a continuación (Figura 31):

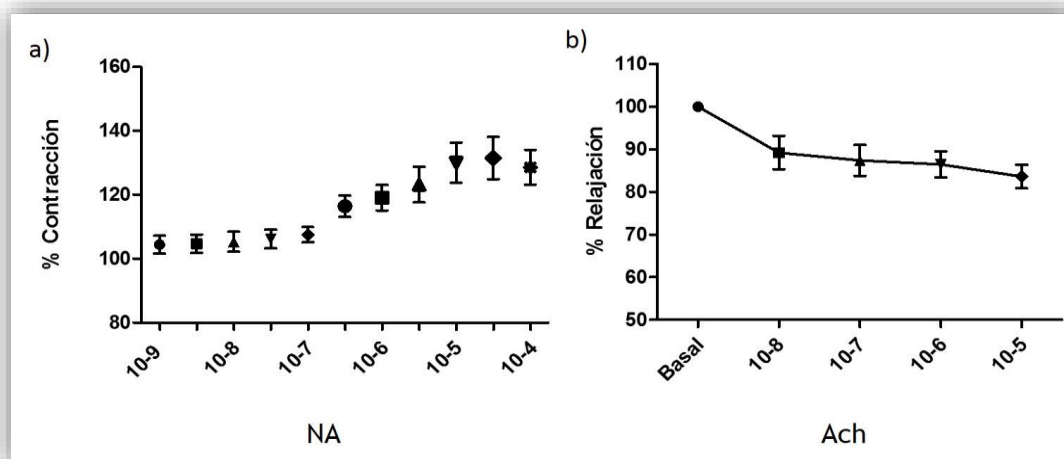


Figura 31. Curvas de contracción y relajación para determinación de concentración óptima a utilizar. En a) Noradrenalina y b) Acetilcolina. Las curvas muestran la media \pm SD. Análisis de Anova, $P = 0.001$. $N = 14$ por grupo.

Cabe destacar que en la mayoría de las arterias debido a factores externos, como: tipo de cirugía, cauterización o factores propios del paciente como la edad, la respuesta vasodilatadora fue muy limitada y en algunos casos, para los experimentos finales de reactividad, se aplicó un segundo vasodilatador, de esta forma los experimentos de reactividad se llevaron a cabo en 36 arterias. Posteriormente, se correlacionó el porcentaje de relajación con factores que pueden influir en la respuesta obtenida como: el diámetro basal de las arterias, los datos clínicos de los pacientes y el porcentaje de contracción.

Así, al evaluar la interacción de los factores antes mencionados, obtuvimos el siguiente modelo de evaluación: **porcentaje de relajación (%Rel ~ a la edad + diámetro basal + la presencia de hipercolesterolemia + % contracción (tabla 17).**

Variable	B-estimada	p	Eta 2
Edad	-0.327508	0.03464	5,6%
Diámetro Basal	-0.009181	0.00307	11,8 %
Hipercolesterolemia	7.990252	0.02365	8,6%
% Contracción	0.811836	< 0.001	40,2%

Tabla 17. Variables asociadas en forma independiente al nivel de relajación observada. La primera columna es el valor de la B (signo y valor parcial de la regresión estimada para la variable), la segunda columna el valor de p y la tercera, Eta2 (proporción de la variación del % de relajación, explicada cuando las otras variables explicativas permanecen constantes). R^2 múltiple = 0,66; ajustada = 0.60.

Observamos una correlación directa y estadísticamente significativa con el porcentaje de contracción ($p < 0.001$) y con la presencia de hipercolesterolemia ($p = 0.0236$) y de forma indirecta y estadísticamente significativa con el diámetro basal ($p = 0.003$) y con la edad ($p = 0.0346$) (Figura 32). Estos factores contemplados, explican el 60% de la relajación observada en los pacientes, y el 40 % restante, es explicado por otros factores no contemplados en el estudio.

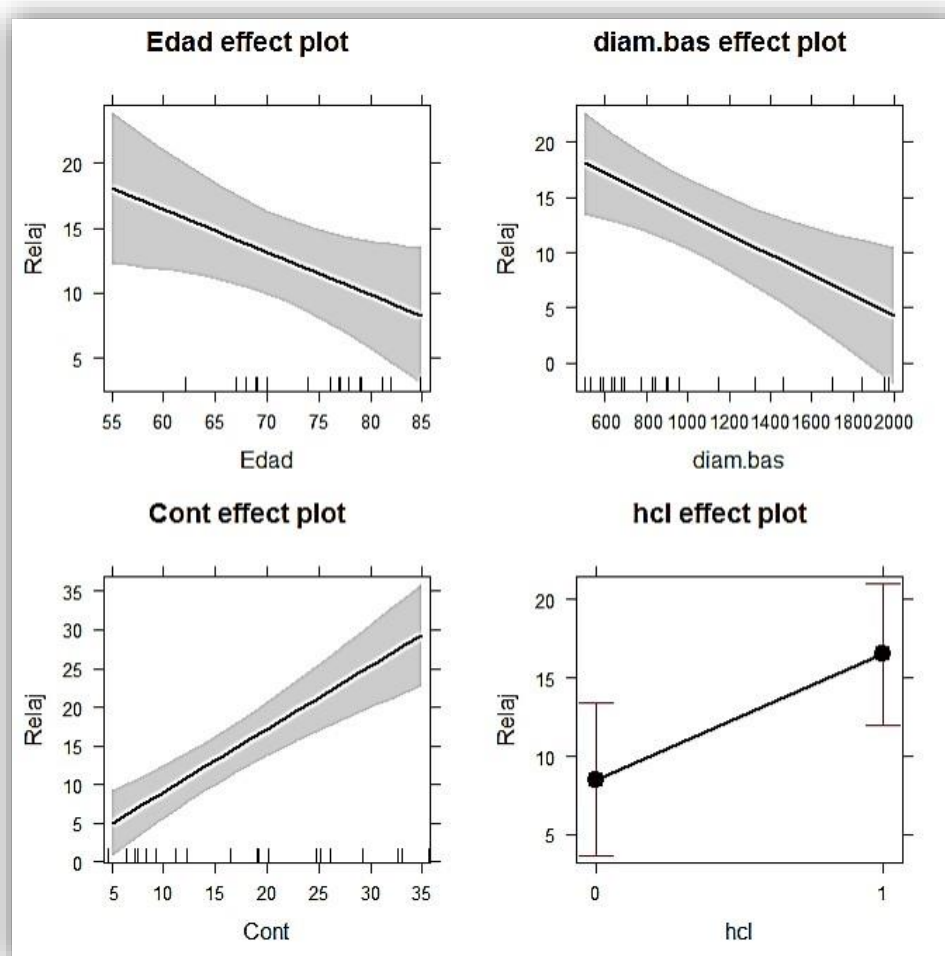


Figura 32. Graficas representativas del porcentaje de relajación observados y el efecto de los factores de riesgo en el modelo de estudio analizado. Diam.bas: diámetro basal; Cont: porcentaje de contracción. Hcl: hipercolesterolemia.

Una vez estandarizada la técnica de medición de reactividad vascular, se estudió el efecto de adhesión en flujo de las EPCs en las arterias de 6 pacientes en las cuales se completó el experimento, el cual consistió en una

primera evaluación de la reactividad (ver descripción en material y métodos), posteriormente se hizo pasar el flujo constante de EPCs a través de la arteria y finalmente se evaluó la reactividad (Figura 33). Al realizar el análisis comparativo de la contracción inicial (sin EPCs) vs final (post EPCs), no observamos cambios significativos, pero si una tendencia a una menor contracción después del flujo de EPCs; de igual forma, al evaluar el efecto en la relajación post EPCs, observamos una tendencia a una mayor relajación en las arterias estudiadas, aunque el efecto no es significativo.

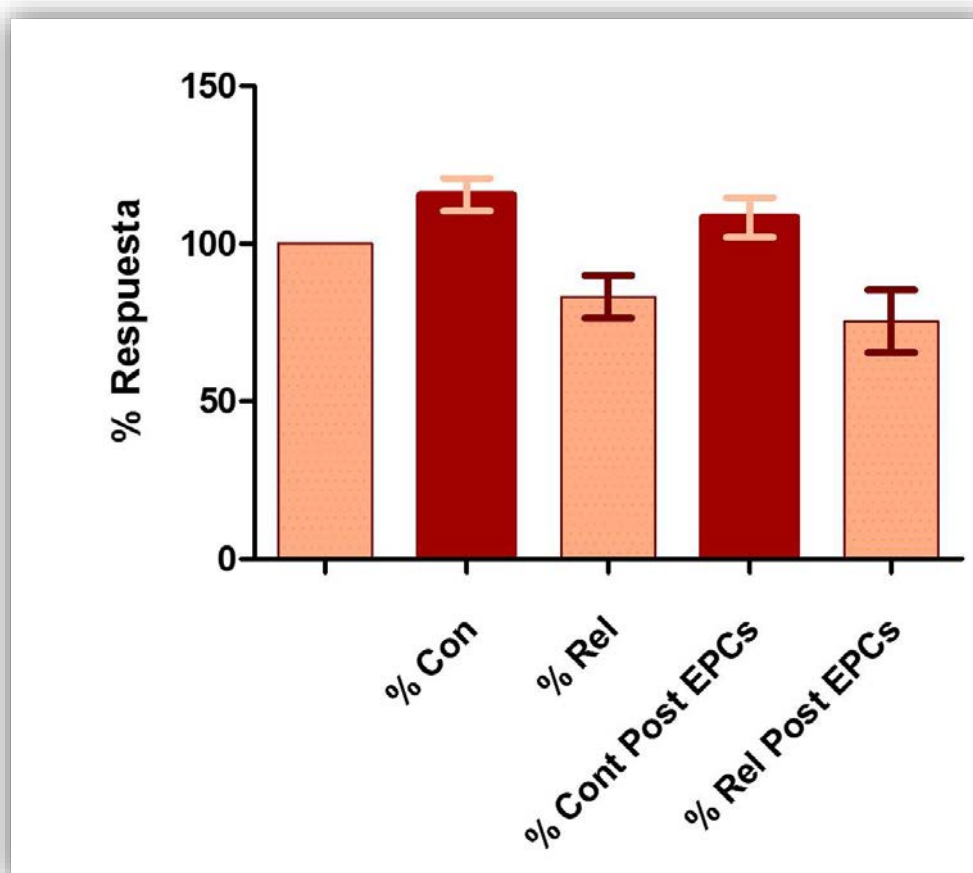


Figura 33. Gráfico de la respuesta vasoconstrictora y vasodilatadora observada en las arterias estudiadas. Se muestra el porcentaje de contracción y relajación respecto al basal de cada arteria (N=6). Las comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA, con prueba de Bonferroni post-hoc. Los gráficos de barras muestran la media \pm SD. N=6

4.4.4 Efecto en la expresión del eje SDF1/CXCR4, de las células progenitoras endoteliales en arterias humanas, sometidas a la adhesión por flujo en un modelo “ex vivo” de reactividad vascular

Posterior al flujo constante de EPCs durante una hora, se estudió el efecto en la expresión de SDF1 en las arterias con y sin flujo de EPCs. No se observaron cambios en la expresión, solo en algunas zonas endoteliales se observaron células con mayor intensidad, en el caso de las arterias con el flujo de EPCs (Figura 34).

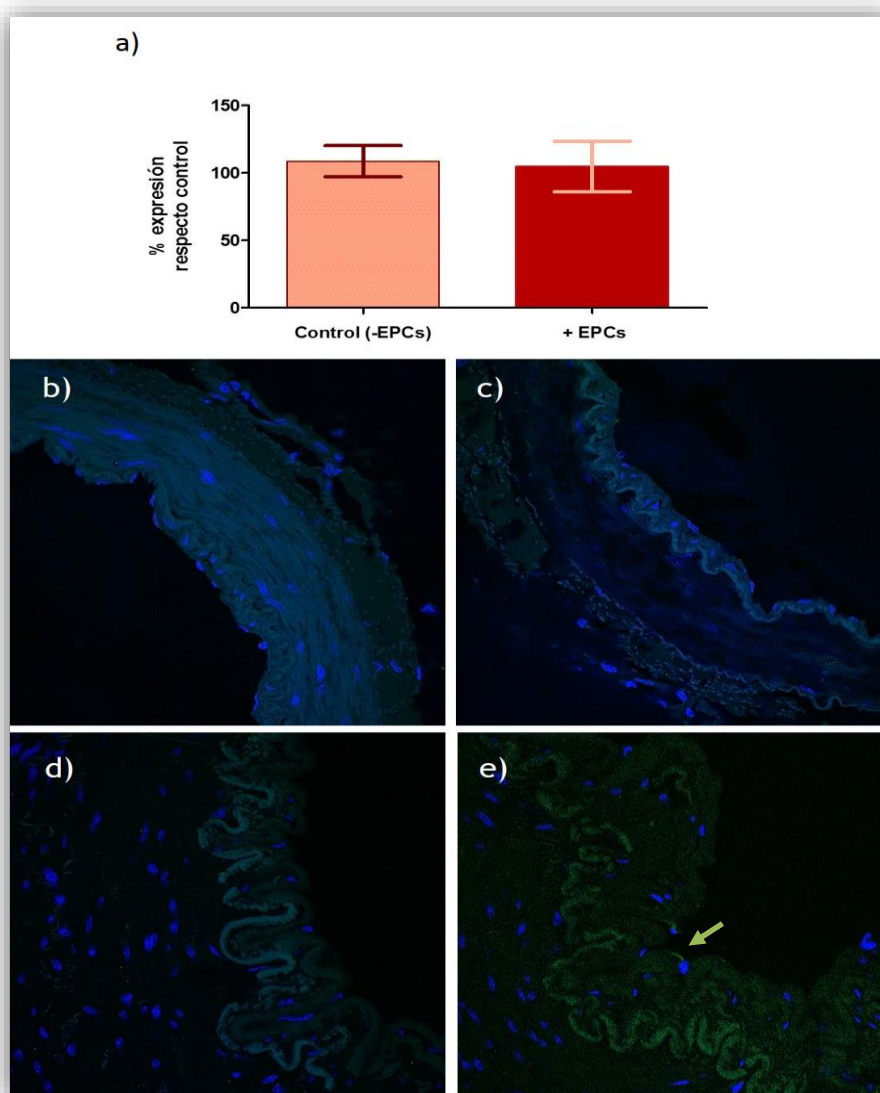


Figura 34. Expresión de SDF1 en arterias mesentéricas pre y post flujo de EPCs. a) Gráfico comparativo de la expresión de SDF1 pre y post EPCs; b) arteria control sin anticuerpo; c) arteria control sin EPCs; d) arteria control sin anticuerpo post EPCs; e) arteria post EPCs. Prueba t de student. Los gráficos de barras muestran la media \pm SD. N=3 por grupo.

En el caso de la expresión de CXCR4, no se observaron cambios significativos al comparar las arterias con y sin flujo de EPCs. De igual forma que en los datos observados con SDF1, destacan algunas células con mayor intensidad para CXCR4 en la zona endotelial (Figura 35).

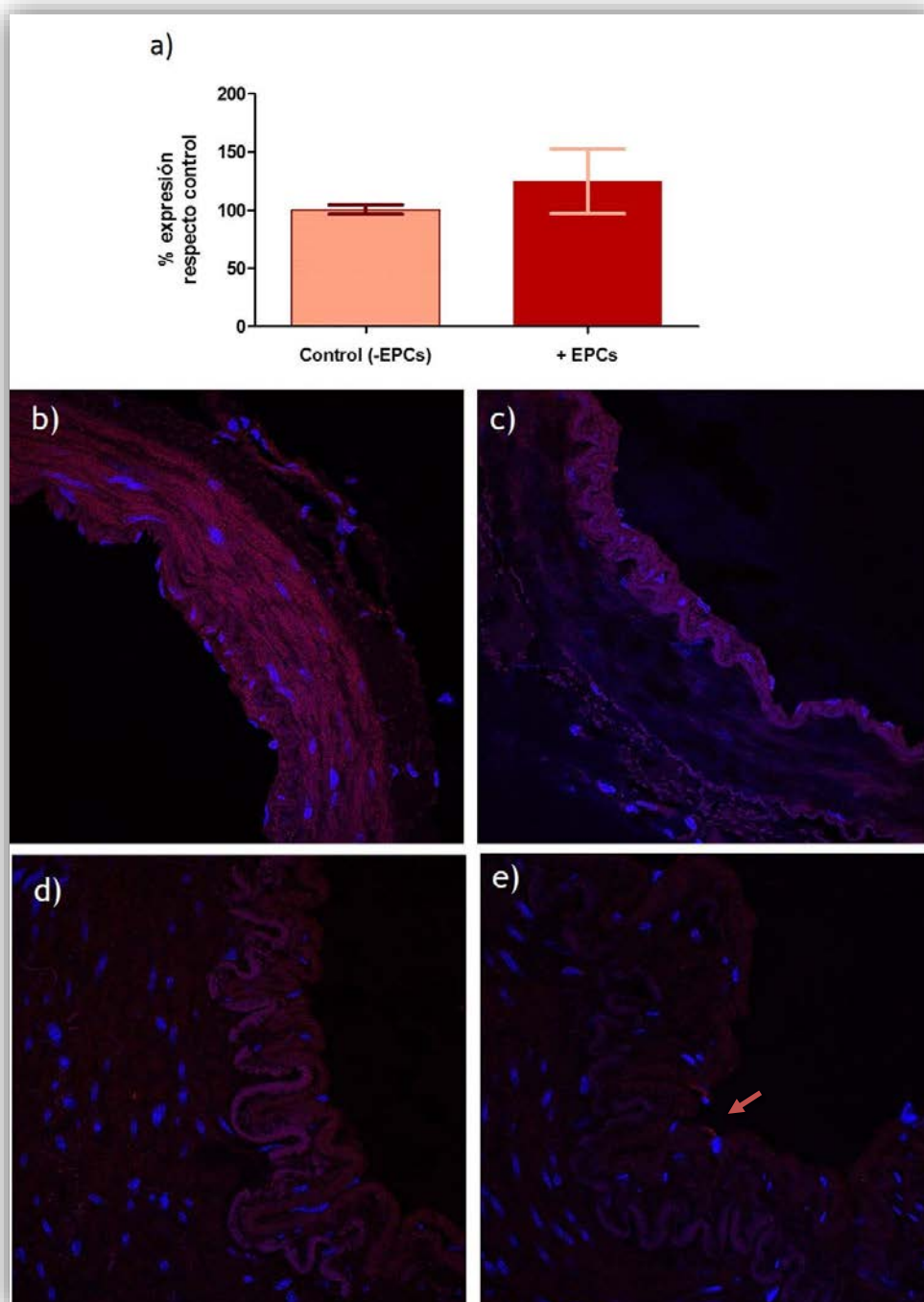


Figura 35. Expresión de CXCR4 en arterias mesentéricas pre y post flujo de EPCs. a) Grafico comparativo de la expresión de CXCR4 pre y post EPCs; b) arteria control sin anticuerpo; c) arteria control sin EPCs d) arteria control sin anticuerpo post EPCs; e) arteria post EPCs. Prueba t de student. Los gráficos de barras muestran la media \pm SD. N=3 por grupo.

4.5. Papel del factor de transcripción Ets-2 y su relación con moléculas de adhesión y regulación endotelial

4.5.1. Expresión del factor de transcripción Ets-2

Se estudió la expresión de Ets2 en 69 pacientes sometidos a RV y se compararon con 26 pacientes sometidos a valvuloplastia por estenosis aórtica como grupo control. Se ajustaron por edad y se seleccionó sólo a aquellos pacientes sin datos de sintomatología mayor o datos de endocarditis y cuyo procedimiento fuera de bajo riesgo.

A continuación se describen las características descriptivas de ambos grupos de pacientes (Tabla 18). El 22% de los pacientes sometidos a revascularización fueron mujeres, la media de edad fue muy similar entre ambos grupos (64.6 ± 9 vs 65.8 ± 9) y se observando diferencias estadísticamente significativas en la presencia de DM2 (48% vs 15%), así como en la presencia de hiperlipidemia (67 vs 44%) y solo el 9% de los pacientes sometidos a valvuloplastia refirieron ser fumadores activos. En el caso de hipertensión, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

	Pacientes Revascularizados	Pacientes valvulopatías	P
Sexo			
Hombres	(54/69) 78%	(14/26) 54%	0.018¶
Mujeres	(15/69) 22%	(12/26) 46%	
Edad	64.6 ± 9	65.8 ± 9	0.587†
DM2	(33/69) 48%	(4/26) 15%	0.003¶
Hiperlipidemia	(46/69) 67%	(10/24) 44%	0.048¶
HTA	(54/69) 78%	(19/28) 73%	0.593¶
Tabaquismo			0.061¶
No	(26/68) 38%	(14/22) 64%	
Si	(21/68) 31%	(2/22) 9%	
Ex	(21/68) 31%	(6/22) 27%	

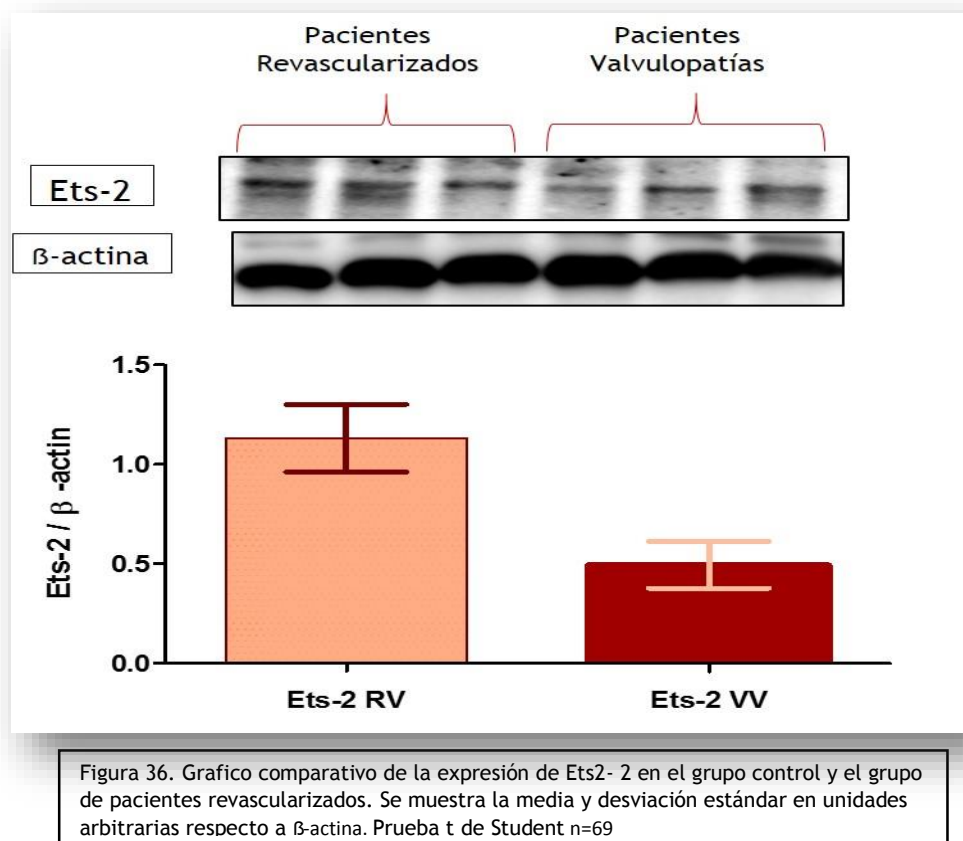
Tabla 18. Características descriptivas del grupo de pacientes revascularizados y con valvulopatías estudiados. †= Prueba t de student. ¶= Prueba de Pearson's. N= 69

Al analizar los parámetros bioquímicos, destacan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de glucosa, ya que son más elevados en los pacientes revascularizados. De igual forma, los niveles de creatinina, en el caso de los pacientes revascularizados son mayores, pero dentro de los parámetros considerados como normales. Y finalmente, el número de monocitos fue menor en los pacientes con valvulopatías (Tabla 19).

	Grupo total	Pacientes Revascularizados	Pacientes valvulopatías	P
Glucosa (mg/dl)	124,7±56	133,5 ± 62,1	99,4 ± 19,2	<0,0001 ¶
Creatinina	0,9 ± 0,2	1,07 ± 0,3	0,88 ± 0,2	0,0046¶
Filtrado Glomerular	69,7 ± 11,7	68,4 ± 14,2	71,02 ±10,1	0,1576¶
Leucocitos	6953± 2140	7283 ± 2017	6004 ± 2239	0,0833¶¶
Plaquetas (u/L)	210828 ± 68972	217898 ± 73028	190500 ± 51770	0,1835¶¶
Monocitos (u/L)	609,6± 223	647 ± 225	500 ± 176	0,0102¶

Tabla 19. Variables bioquímicas de la cohorte de pacientes revascularizados. División en grupos de pacientes revascularizados y con valvulopatías. ¶ = Prueba t de Student. ¶¶ = Prueba U de Mann-Whitney.

Al analizar la expresión del factor de transcripción Ets2 por Western blot, se observó una mayor expresión significativa ($p = 0,0285$), en los pacientes sometidos a RV ($1,132 \pm 1,1$) en comparación con el grupo control ($0,496 \pm 0,513$) (Figura 36).



Debido a los resultados observados en los grupos de pacientes revascularizados, se realizó un análisis de la expresión dividiéndolos por grupos de evolución y se observó un aumento inicial en aquellos pacientes sin factores de riesgo cardiovascular ($2,122 \pm 1,485$) que fueron sometidos a la cirugía de revascularización ($p = 0,0007$). Posteriormente se observó una disminución en la expresión en los demás grupos estudiados (1 a 6 meses= $1,163 \pm 0,8639$; de 7 a 12 meses= $1,064 \pm 0,5852$; de 13 a 60 meses= $0,9177 \pm 0,3428$ y más de 60 meses= $0,5615 \pm 0,3136$) al comprarlos con el grupo sin antecedentes y con el grupo control ($0,6180 \pm 0,3136$) (Figura 37).

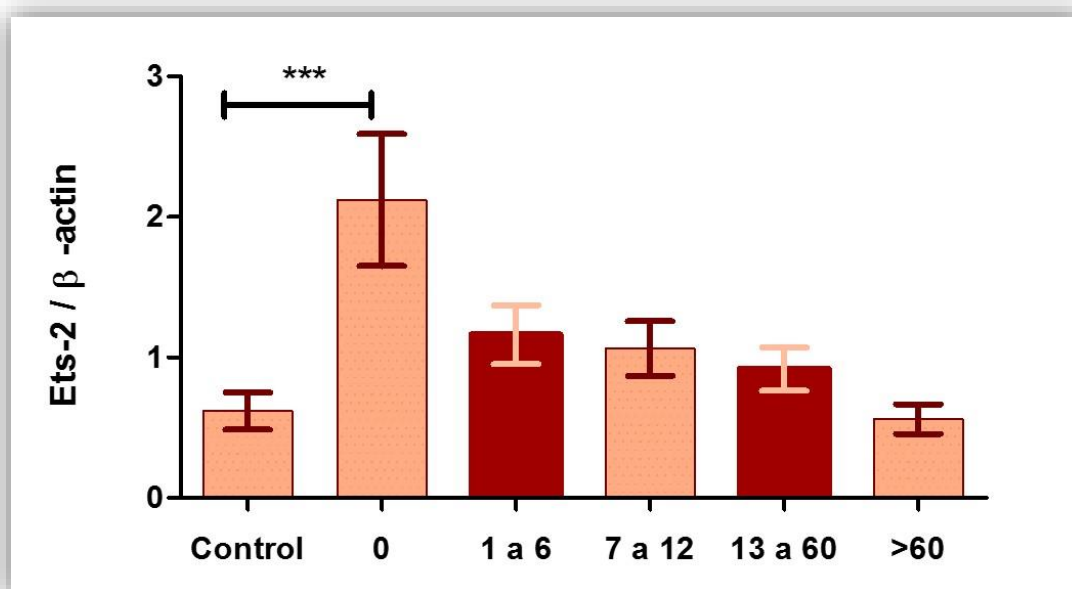


Figura 37. Grafico comparativo de la expresión de Ets-2. División en grupo control, grupo de pacientes sin factores de riesgo cardiovascular y pacientes revascularizados en diferentes etapas de evolución. Se muestra la media y desviación estándar en unidades arbitrarias respecto a β-actina. Las comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA, con prueba de Dunnett post-hoc. *** p < 0,0001 n=65.

Posteriormente se correlacionó la expresión de Ets-2 en el grupo de pacientes revascularizados con los factores de riesgo cardiovascular (parámetros clínicos y bioquímicos) y factores asociados a la reparación endotelial (CD105, CXCR4 y SDF1), para determinar la contribución independiente de cada uno de estos factores estudiados en la expresión de Ets-2 observada.

Con lo cual, el modelo de estudio final (**Ets-2 ~ Edad + tiempo de evolución + HPL + CD105**) (Tabla 20), explica el 58% de los niveles de expresión de Ets-2 observados y el 41.5% restante corresponde a otras variables no contempladas en el estudio.

Destaca una correlación directa y significativa con la edad (p= 0.045) y con la expresión de CD105 (p= 0.008524) y de forma indirecta y significativa con la evolución (p= 0.00844), y en el caso de hiperlipidemia sin significancia estadística (p=0.1770) (Figura 38).

	β - estimada	Eta2	p
Edad	0.03246	7,8 %	0.045342
Evolución			
0	-1.45489	38,4 %	0.008447
1 a 6	-0.96962		
7 a 12	-1.48303		
13 a 60	-1.52848		
> 60			
HLP	-0.46836	2,6 %	0.177098
CD105	0.55050	9,8 %	0.008524

Tabla 20. Variables asociadas en forma independiente al nivel de la expresión de Ets-2, la primera columna es el valor de la β (signo y valor parcial de la regresión estimada para la variable), la segunda columna el valor de p y la tercera, Eta2 (proporción de la variación de Ets-2, explicada cuando las otras variables explicativas permanecen constantes). R2 múltiple = 0.58 ajustada = 0.50.

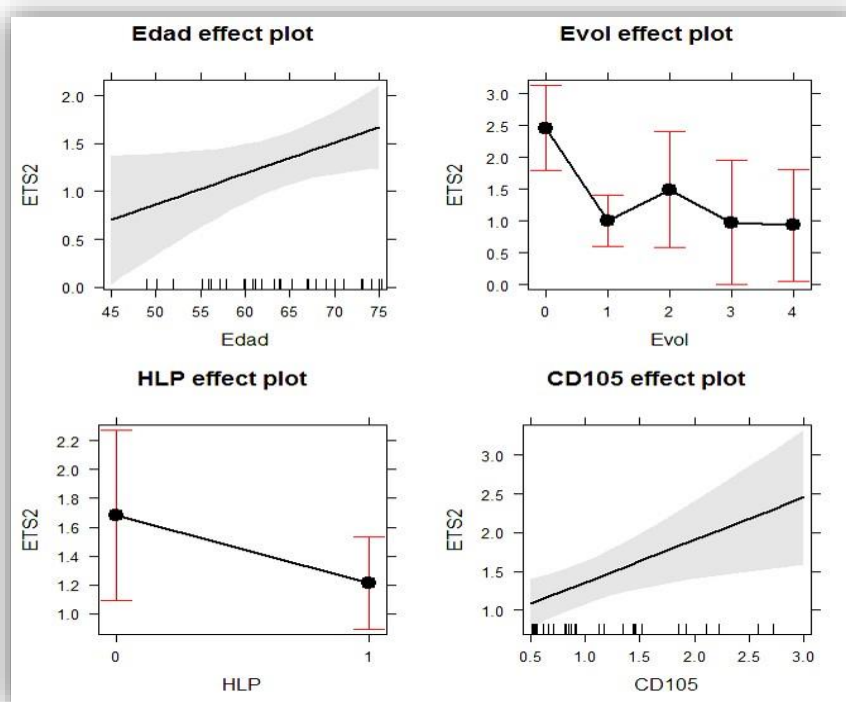


Figura 38. Gráficas representativas de la contribución independiente de los factores de riesgo estudiados (parámetro clínicos) y factores asociados a la reparación endotelial (CD105), en la expresión de Ets-2 en los pacientes revascularizados en el modelo de estudio analizado.

4.5.2. Efecto de la inhibición del factor de transcripción Ets-2, en la funcionalidad de las EPCs en cultivo

Se realizaron varias pruebas de inhibición con los diferentes inhibidores, solos o en combinación para Ets-2. Los cultivos se observaron a los 7 días de crecimiento. La mejor opción observada fue: s4850 + s4851 + s4852 (Figura 39):

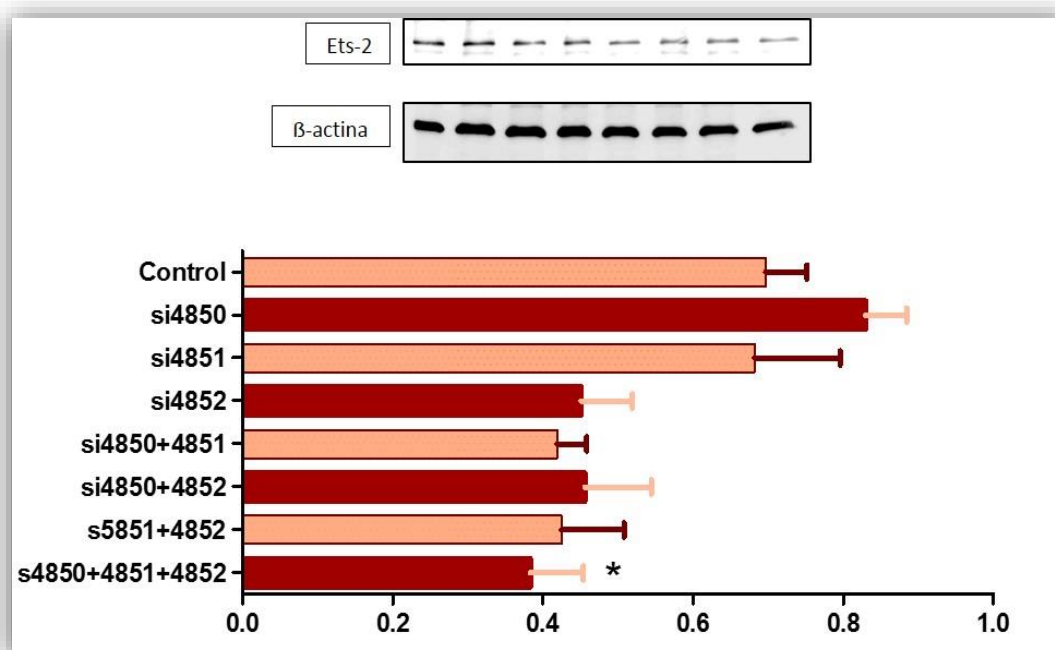


Figura 39. Grafico comparativo de la expresión de Ets2- 2 en los cultivos de EPCs el grupo control y en los diferentes cultivos con las diferentes combinaciones de SiRNAs. Se muestra la media y desviación estándar en unidades arbitrarias respecto a β-actina. . Las comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA, con prueba de Dunnett post-hoc. *** p <0,0001.

Al realizar los experimentos para verificar por Western blot el efecto de la inhibición de Ets-2 (SiRNAs) en los cultivos de EPCs, se observó una tendencia a menor formación de colonias, con la combinación de inhibidores (s4850 + s4851 + s4852) para silenciar la expresión de Ets-2, aunque no estadísticamente significativo. Las células eran de morfología más monocítica y las colonias de menor tamaño en comparación con los cultivos control.

En los cultivos con medio condicionado + los inhibidores (s4850 + s4851 + s4852), se observó que la formación de colonias era similar a los controles,

pero de mayor tamaño y número celular, la morfología incluía células de aspecto epitelioide (mas alargadas) alrededor de la colonia en formación, es de destacar que el número fue menor que en el control con medio condicionado, aunque no estadísticamente significativo (Figura 40).

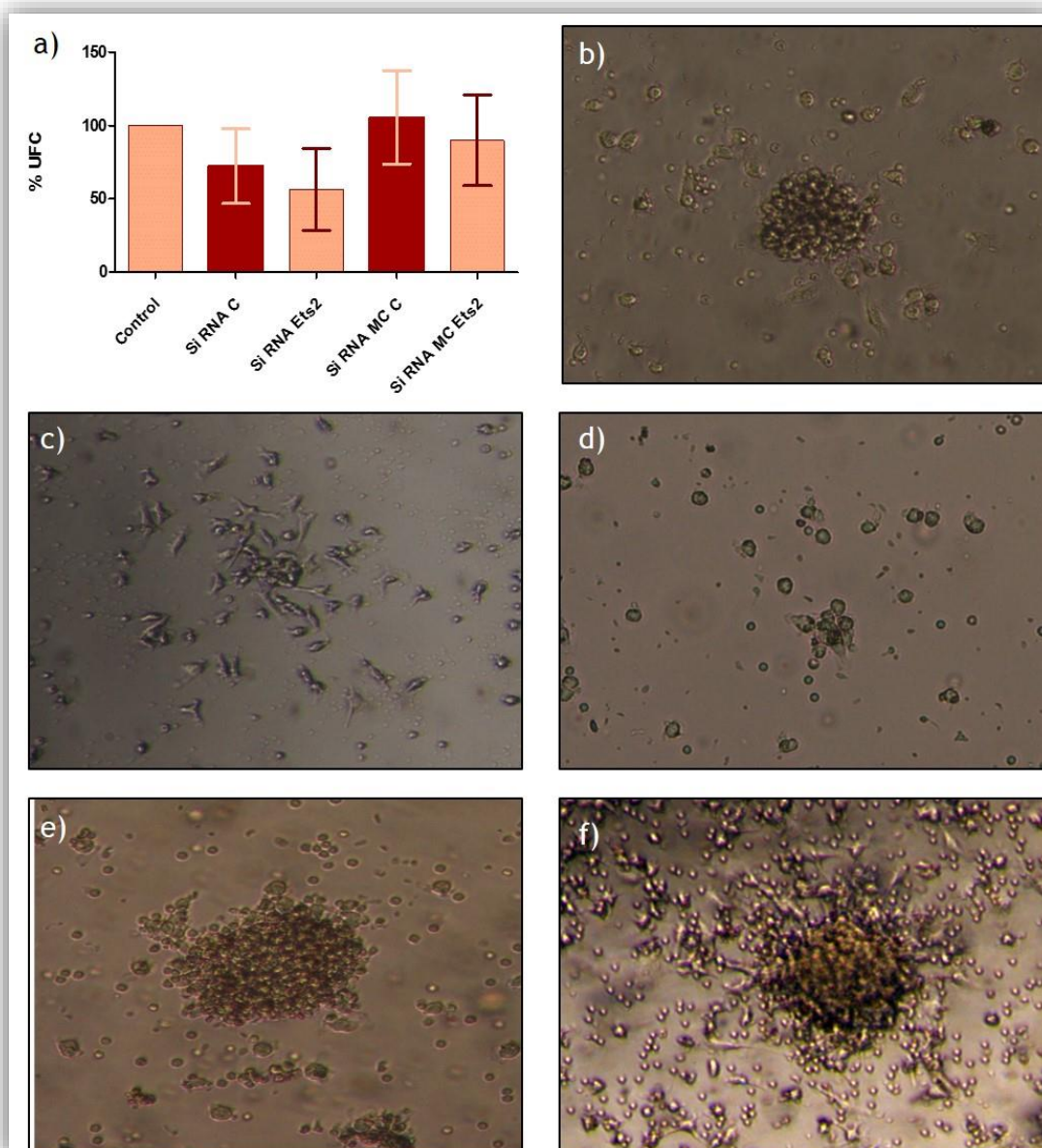


Figura 40. Efecto de los SiRNAs en la proliferación de cultivos de EPCs. a) Grafico comparativo de proliferación en UFC, resultados en porcentaje respecto al control; b) cultivo control; c) cultivos SiRNAcontrol; d) cultivo con los SiRNA: s4850 + s4851 + s4852; e) cultivo con el medio condicionado del SiRNA control; f) cultivo con medio condicionado de los SiRNA: s4850 + s4851 + s4852. Las comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA, con prueba de Dunnett post-hoc. Los gráficos de barras muestran la media \pm SD. UFC: unidades formadoras de colonias. N=7

Al inhibir la expresión Ets-2, se verificó la expresión de CD105 (Endogлина). No observamos cambios significativos en la expresión, pero si una disminución con tendencia significativa ($p = 0,1440$) en los cultivos de EPCs con Ets-2 silenciado (SiRNA50 + SiRNA51 + SiRNA52). De igual forma, en el grupo con medio condicionado, se observa una disminución en la expresión comparada con el control (Figura 41).

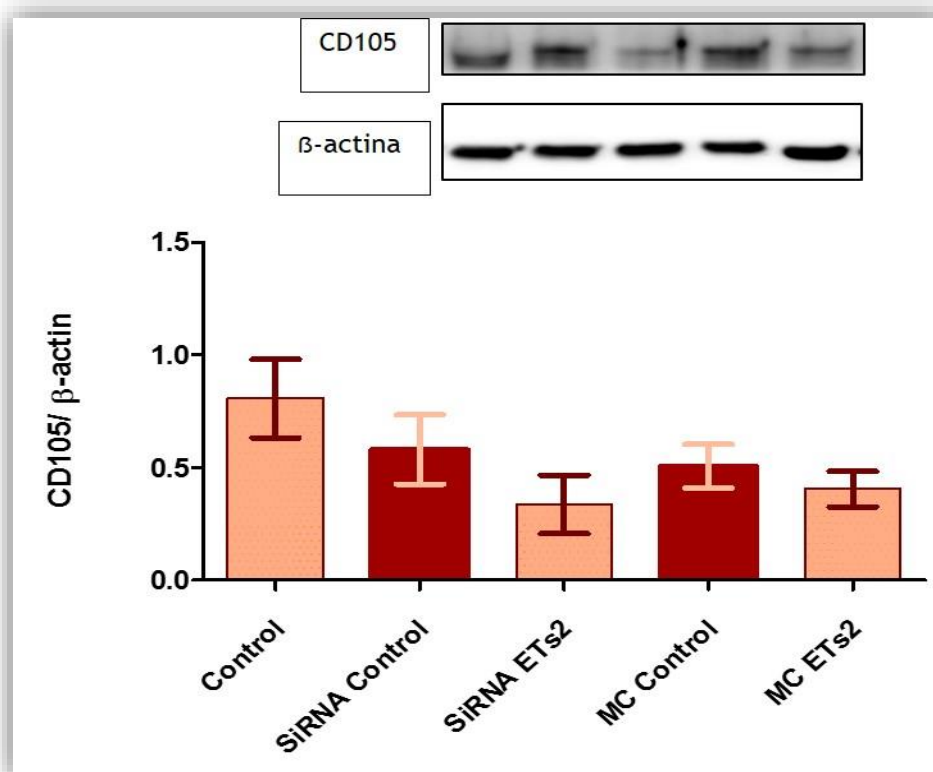


Figura 41. Gráfico comparativo de la expresión de CD105 en el grupo control, SiRNA control, SiRNA Ets-2, medio condicionado control y mediocondicionado de SiRNA Ets-2. Se muestra la media y desviación estándar en unidades arbitrarias respecto a β-actina. Las comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA, con prueba de Dunnett post-hoc. n=7

En el análisis de la expresión de CD144, los cambios observados en la expresión comprados con los cultivos control no fueron significativos ($p = 0,4888$), pero se observó un discreto aumento en la expresión en el grupo con Ets-2 silenciado, al igual que en los grupos con el medio condicionado (Figura 42).

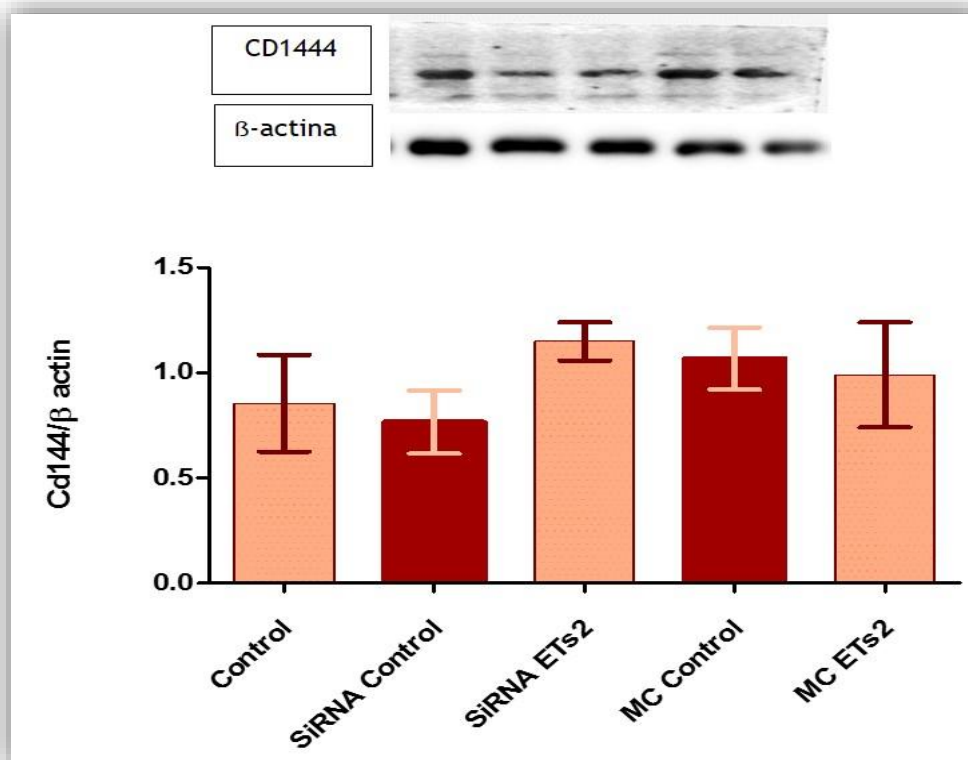


Figura 42. Grafico comparativo de la expresión de CD144 en el grupo control, SiRNA control, SiRNA Ets-2, medio condicionado control y mediocondicionado de SiRNA Ets-2. Se muestra la media y desviación estándar en unidades arbitrarias respecto a β-actina. Las comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA, con prueba de Dunnett post-hoc. n=7

Al evaluar el efecto en la expresión de CXCR4 en los cultivos de EPCs con la inhibición de Ets2 (siRNA50 + siRNA51 + siRNA52), se observó un aumento en la expresión comparado en el grupo control, aunque no estadísticamente significativo ($p = 0,7584$). En los cultivos con medio condicionado no se observaron cambios comparados con el grupo control o con los cultivos con la inhibición de Ets-2 (Figura 43).

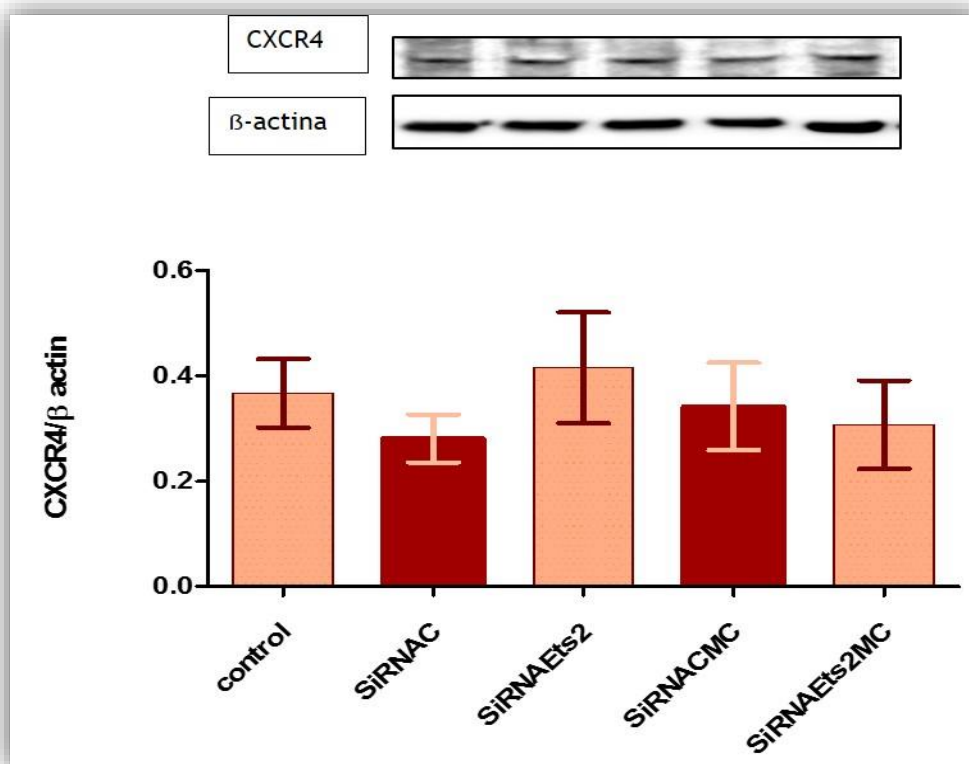


Figura 43. Grafico comparativo de la expresión de CXCR4 en el grupo control, SiRNA control, SiRNA Ets-2, medio condicionado control y medio condicionado de SiRNA Ets-2. Se muestra la media y desviación estándar en unidades arbitrarias respecto a β-actina. . Las comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA, con prueba de Dunnett post-hoc. n=7

V. DISCUSIÓN

La enfermedad cardiovascular sigue siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial en países desarrollados, fundamentalmente en pacientes con DM tipo 2, se ha descrito que en algunas poblaciones puede representar el 50% o más de las muertes por diabetes (Joseph y Golden, 2014). Esto se debe en gran medida a factores ya conocidos como la predisposición genética, la aterogénesis acelerada, la inflamación crónica, la isquemia silente y la presencia de patologías co-existentes como la hipertensión o la dislipidemia. La diabetes es sin duda alguna, uno de los problemas de salud más graves del siglo XXI y actualmente en España, la prevalencia nacional es de 10,83% (FDI 2013).

Es bien sabido que las células progenitoras endoteliales juegan un papel clave en los procesos de reparación endotelial. En los pacientes con DM tipo 2 y enfermedad cardiovascular, se sabe que la funcionalidad de las EPCs es deficiente, aunque el mecanismo exacto de disfunción aún es incierto. Además, está bien descrito que en la evolución natural los pacientes con DM tipo 2 presentan un mayor número de complicaciones y con mayor frecuencia estos pacientes estarán abocados a procedimientos de revascularización. Existen, múltiples estudios (Sidhu y Boden, 2015; Verma et al., 2013) que han señalado la importancia de una adecuada terapia de reparación endotelial (terapia con EPCs), que ayudaría a disminuir las alteraciones en los procesos de reendotelización en los pacientes con DM tipo 2 y enfermedad cardiovascular, y por consiguiente disminuiría la aparición de la enfermedad cardiovascular (ECV).

Debido a su función primordial en los procesos de proliferación y migración de las EPCs (Doring et al., 2014), en los últimos años el eje SDF1 y su co-receptor CXCR4 se han convertido en un elemento clave en el estudio de la enfermedad cardiovascular. Así, se ha hipotetizado que los factores de transcripción, miembros de la familia E26 (ETS), participan de forma activa en la evolución de la patología cardiovascular y, en los pacientes con DM tipo 2, la alteración específica del factor de transcripción Ets-2, podría contribuir a la disfunción de las EPCs (Dejana et al., 2007; Seeger et al., 2009).

Con estos datos en mente, nos propusimos estudiar las alteraciones en el eje SDF1 y su co-receptor CXCR4 y la posible participación del factor de transcripción Ets-2 en la disfunción de las EPCs en los pacientes con DM tipo 2 y enfermedad cardiovascular.

Al analizar la cohorte de pacientes evaluados los resultados iniciales del estudio, indican una mayor prevalencia de enfermedad cardiovascular en hombres que en mujeres, pero destaca un porcentaje mayor de mujeres diabéticas revascularizadas en comparación con no diabéticas. Pensamos que esta diferencia podría ser explicada, por la disminución del efecto protector que confieren los estrógenos; ya que se ha descrito (Monteiro et al., 2014), que es después de la menopausia cuando se manifiestan alteraciones como disfunción metabólica, aumento de obesidad visceral, dislipidemia y resistencia a la insulina, y en el caso particular de las mujeres con DM tipo 2, pensamos que este descontrol es mayor, y por lo tanto ocasionaría un daño endotelial superior a las mujeres no diabéticas. Un hecho importante observado, es que la patología cardiovascular se presenta con mayor frecuencia en edades tempranas tanto en pacientes diabéticos como no diabéticos ($67,2 \pm 9$ vs $65,6 \pm 12$ años), a pesar del énfasis realizado en los últimos años en la de detección y tratamiento oportuno. Como ya se ha mencionado en la introducción, independientemente de los factores de riesgo no modificables, esta aparición temprana se debe en gran medida a factores como la inactividad física, el sobrepeso o la obesidad (Taskinen y Boren, 2015; FDI 2013) factores prevalentes que están aumentado en la población general. En virtud de lo anterior, la prevalencia observada de obesidad fue de 30% tanto en los pacientes diabéticos como en no diabéticos, similar a los resultados observados por Félix-Redondo y cols. de 28% para ambos sexos (Felix-Redondo et al., 2013). Sin embargo, hay que considerar de forma importante que más del 50% de los pacientes estudiados están en etapas de pre-obesidad, con lo cual el enfoque tendría que ser mayor en este grupo de pacientes.

Haciendo alusión a la presencia de patologías asociadas a la DM tipo 2, los resultados observados en nuestra cohorte, indican una prevalencia similar a resultados previos de nuestro grupo (Redondo et al., 2012) y a los datos

recientemente publicados por Iqbal y cols., (Iqbal et al., 2015), respecto a hipertensión, dislipidemia y tabaquismo; en cuanto a DM tipo 2, la prevalencia observada en nuestro grupo fue mayor (46% vs 29%); al igual que el antecedente de infarto previo (47% vs 37%) y el promedio en la escala EuroSCORE 5,2 vs 3.55. Respecto a estos resultados, debemos tomar en cuenta que nuestro estudio se ha enfocado a pacientes con DM tipo 2, y es en este grupo de pacientes, donde se observa con mayor frecuencia los infartos repetitivos y por lo tanto, el riesgo pre-operatorio es mayor.

Al analizar la prevalencia de hipertensión en nuestro grupo de pacientes y dividirlos en pacientes diabéticos y no diabéticos, no observamos diferencias significativas. No realizamos un análisis de los niveles de Presión Arterial Sistólica y Presión Arterial Diastólica en los pacientes, pero tendría que considerarse en análisis futuros, debido a que el porcentaje considerable de los pacientes revascularizados no tiene antecedentes de hipertensión, pero si han referido tomas aisladas con cifras altas de tensión arterial.

Estudios previos mostrados por Martínez-Hervas y cols. (Martínez-Hervas et al., 2014), mostraron una prevalencia de dislipidemia similar a la observada por nosotros, pero fue mayor en nuestro grupo de pacientes diabéticos (DM2=82% vs NoDM2=55%). Considerando que la dislipidemia es uno de los principales factores relacionados con las complicaciones en pacientes con DM tipo 2 y enfermedad cardiovascular, la posible explicación de estos datos pensamos que está relacionada con el aumento de factores ya mencionados como sobrepeso y obesidad, principalmente en población adulta joven en edad laboral (Vazquez et al., 2014), en los cuales es difícil que por el ritmo de vida tengan un adecuado adherencia al tratamiento, en el caso de los pacientes en edad avanzada, el factor principal de abandono, es la presencia de afectos adversos como miopatías o trastornos gastrointestinales. Otro factor a considerar es que recientemente se ha asociado el uso de estatinas con el desarrollo de DM tipo 2 (Swerdlow et al., 2015), y considerando que el 74% de nuestros pacientes diabéticos toman este tipo de fármacos, es necesario profundizar en la investigación, ya que hasta ahora sólo se ha asociado a variantes de la HMG-co A reductasa.

Respecto a los valores observados en las variables bioquímicas de nuestra cohorte, destacan mayores niveles de glucosa preoperatorios en los pacientes diabéticos 159,1 mg/dl en comparación con 100,6mg/dl en los pacientes no diabéticos. En algunos casos, los valores de glucosa observados en los pacientes diabéticos, fueron cercanos a los 400mg/dl. Hay que considerar que estos resultados nos hablan del poco control de la glucosa que tienen los pacientes, y que gran parte de ellos, a pesar de llevar un tratamiento, la cronicidad de la enfermedad, haría necesaria la implementación de un segundo fármaco o en etapas más avanzadas, el uso de insulina. Ya otros estudios previos como el propuesto por Székely y cols., han descrito una asociación de los niveles máximos de glucosa y el tratamiento de la DM tipo 2 (Szekely et al., 2011). Las demás variables consideradas (creatinina, filtrado glomerular, leucocitos o plaquetas), tuvieron un comportamiento similar en ambos grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos.

En lo que respecta a las diferencias observadas en el tiempo de evolución, es esperado que dada la evolución natural de la enfermedad diabética, con el tiempo se observen un mayor número de complicaciones y por lo tanto, la necesidad del tratamiento intervencionista aumente. Esto, a pesar de que el adherencia observado en la tratamiento para las diversas patologías asociadas fue importante (hipertensión 90%; dislipidemia 75%); destaca el hecho de que los pacientes que presentan este porcentaje de apego, tienen un esquema de tratamiento complejo con 2 o más fármacos, lo que nos hablaría que en los pacientes diabéticos, uno de los principales factores implicados es el adecuado control de la glucemia para evitar un mayor grado de disfunción endotelial.

Por otro lado, para explicar el hecho que un gran porcentaje de pacientes no diabéticos son llevados a terapias intervencionistas o de revascularización, debemos considerar que la edad y momento de detección de la enfermedad son factores decisivos en la evolución de la patología cardiovascular; ya que principalmente los pacientes en edad laboral y no diabéticos, no hacen uso de los fármacos. Esto concuerda con los resultados descritos recientemente por Iqbal y cols., en los cuales la proporción de pacientes que siguen un

tratamiento de forma adecuada para las diferentes patologías asociadas a la diabetes, previo a la revascularización fue sólo de 29,1%; esto implicaría, que sin el adecuado control, el deterioro y la disfunción endotelial ocasionada por la hipertensión o dislipidemia, conlleva a la aparición más temprana de infartos y la consiguiente necesidad de los procedimientos de revascularización en este grupo de pacientes no diabéticos.

Con estos datos en mente, nos llevó a entender en parte, el aumento de complicaciones cardíacas post operatorias observadas en los pacientes no diabéticos. Y en el caso de los pacientes diabéticos, los factores ya establecidos (aterogénesis acelerada, la inflamación crónica, la isquemia silente y la presencia de patologías co-existentes) aumentan la gravedad y por lo tanto, la mortalidad. Los resultados concuerdan por lo tanto, con el gran porcentaje de mortalidad en pacientes diabéticos descrito por Kurlansky y cols., en los cuales, pone de manifiesto la importancia de implementar nuevas terapias que ayuden a reducir la mortalidad en pacientes diabéticos, ya que a pesar de que la gran mayoría son tratados previamente con terapias farmacológicas, el daño fisiológico no se contrarresta de forma adecuada (Kurlansky et al., 2015).

La primera pregunta en este estudio buscó determinar si la funcionalidad de las EPCs en pacientes diabéticos y no diabéticos y/o ateroscleróticos es adecuada para contrarrestar el daño endotelial, contribuyendo al remplazo del endotelio disfuncional y reparación de los tejidos después de una lesión vascular isquémica. En diversos modelos experimentales y en pacientes (Noels et al., 2014; Saxena et al., 2008; Tong et al., 2014), se ha establecido el papel del eje SDF-1 α /CXCR4 como primordial en la movilización de las EPCs post isquemia, ya que los niveles de SDF-1 α aumentan en la circulación periférica, creando un gradiente de liberación de EPCs. En los pacientes con DM tipo 2, el número de EPCs es reducido (Menegazzo et al., 2012), viéndose alterada la respuesta a la isquemia (Antonio et al., 2014a; Fadini et al., 2005). La disminución en el número de EPCs y las alteraciones en su funcionalidad, se han tratado de explicar por los niveles elevados de glucosa, así como por el estado de inflamación crónica y estrés oxidativo. Así, en estudios recientes en pacientes diabéticos o hiperglicémicos (Ling et al.,

2012; Marfella et al., 2013; Sun et al., 2013), se demostró que a pesar del grado de isquemia o los procedimientos de revascularización en población general, los niveles disminuidos de EPCs no se justificaron por completo; más recientemente, Fortunato y cols., postularon que los niveles de SDF-1 α y la actividad migratoria de las células progenitoras circulantes podrían considerarse predictores independientes de riesgo para padecer infartos repetitivos, fallo cardíaco o muerte en pacientes con antecedente de infarto previo y diabetes. Sin embargo, los niveles de SDF-1 α que observaron estaban disminuidos y la población de pacientes diabéticos estudiada fue solo del 15%.

Dada la complejidad en el entendimiento del tema, en este estudio decidimos tratar de extenderlo desde varios puntos de vista. Realizamos en primer lugar, la determinación de los niveles de SDF-1 α en los pacientes que iban a ser sometidos a revascularización, y así determinar si el gradiente de liberación por el estímulo isquémico previo estaba alterado. Al observar mayores niveles de SDF-1 α en los pacientes no diabéticos sin antecedentes de infarto en comparación con los pacientes diabéticos, comprobamos que en este grupo de pacientes, la respuesta de liberación de SDF-1 α posterior al evento isquémico podría ser la esperada y estos niveles disminuyen a la par de la transición de recuperación post infarto. Posteriormente al ajustar estos valores por factores como edad y hemoglobina glicada observamos una correlación directa, lo que podría indicar que a mayor edad y niveles de hemoglobina glicada, mayores niveles de SDF-1 α observaríamos; Estos resultados concuerdan con los reportados inicialmente por Xiao y cols., en 2008, respecto a la asociación de los niveles de SDF-1 α con la edad. Sin embargo, en lo que respecta a la asociación con los niveles de hemoglobina glicada, nos llevó a cuestionar que factor hace que esta asociación no se cumple, o no como debería. Por lo que al correlacionar los niveles de SDF-1 α con antecedente de infarto y observar un aumento significativo en los pacientes diabéticos a los 7 días del IAM, se podría pensar que estamos ante un estímulo con efecto tardío, el cual explicaría en parte, el por qué estudios como el propuesto por Marfella y cols., en 2013, analizando la liberación de EPCs, demostraron que el pico de liberación de EPCs circulantes se retrasaba

en los pacientes diabéticos en comparación con los pacientes no diabéticos (de 5 días en pacientes no diabéticos a 7 días en pacientes diabéticos).

Hemos observado también una correlación indirecta de SDF-1 α con los niveles de proteínas de alta densidad (HDL) y el uso de terapia con insulina en pacientes diabéticos, resultados similares a los observados más recientemente por Antonio y col., quienes han demostrado que el control glicémico (terapia con insulina), es un factor determinante en los niveles de EPCs circulantes, y que es el estado de hiperglicemia crónica el que alteraría la respuesta de las EPCs a la isquemia (Antonio et al., 2014). Aunado a estos resultados y el hecho previamente comentado de la prevalencia de dislipidemia (mayor LDL y menor HDL), han reforzado nuestro punto de vista respecto a que posiblemente la fluctuación en el control glicémico en los pacientes diabéticos, afectaría el estímulo por hipoxia y por consiguiente, la estimulación al gradiente de liberación de EPCs (mayor SDF-1 α en circulación periférica y menor en médula ósea) podría ser de forma tardía y el uso de una adecuada terapia antidiabética ayudaría en parte a contrarrestar este efecto. Sería interesante comprobar si efectivamente en MO los niveles de SDF-1 α continúan elevados, a pesar del estímulo por isquemia y que se varía disminuido a los 7 días del IAM, pero dado que esto implicaría un estudio doloroso e invasivo, resulta difícil su comprobación.

Una vez evaluado el estímulo inicial de liberación de EPCs y considerando que es en la circulación periférica donde las EPCs se someten a una serie de desafíos moleculares y su funcionalidad también puede verse afectada. Analizamos la expresión de SDF1 y su co-receptor CXCR4 en las EPCs circulantes de los pacientes revascularizados y observamos que en el caso de los pacientes diabéticos la expresión de SDF1 fue menor en comparación con los no diabéticos. Esto podría deberse a la hiperglicemia crónica, la inflamación y las especies reactivas de oxígeno en los pacientes diabéticos. Esto, se ha tratado de evidenciar previamente en estudios en modelos animales de EPCs en cultivo, a los cuales se añadió los productos finales de la glicosilación (AGE) (0-500 μ g/ml) (Li et al., 2012; Zhang et al., 2012), observando una disminución progresiva de SDF-1 α en el sobrenadante de los cultivos, y una disminución de la expresión de CXCR4 en las EPCs cultivadas

solo en la concentración de 500 µg/ml de AGEs. Más recientemente el grupo de António y cols. mostraron que la expresión de CXCR4 disminuía solo en EPCs cultivadas con glucosa (25mM) y esta disminución era mayor en EPCs tardías, sin embargo al cultivar EPCs provenientes de pacientes diabéticos y no diabéticos no hubo diferencias significativas en la expresión (Antonio et al., 2014b). Estos datos y nuestros resultados, evidencian más el hecho de que en los pacientes diabéticos la fluctuación hiperglicémica, altera la funcionalidad de las EPCs, dado la inflamación y las especies reactivas que se generan. Nosotros no hemos comprobado este efecto in vitro, ya que hemos observado que una gran limitante de cultivar EPCs de pacientes diabéticos, es el número disminuido de EPCs circulantes que se pudieran cultivar, la gran mayoría de los medios de cultivo tienen concentraciones normales de glucosa y aún añadiéndola de forma externa, es difícil imitar la fluctuación y la cronicidad glicémica a la que han estado expuestas previamente en los pacientes.

Al considerar factores como género (mujer), la presencia de diabetes, la evolución y el antecedente de infarto, la correlación fue indirecta, ya que con el aumento de estos factores, o su presencia, los valores de expresión de SDF1 son menores en las EPCs circulantes. Con estos resultados, podríamos suponer que en los pacientes diabéticos, la presencia de estos factores y la disminución de SDF1 estarían implicados en la alteración de los procesos de reparación endotelial, lo que condicionaría que en pacientes diabéticos, el proceso no se realizara, o no se realizara de forma adecuada, debido a un posible agotamiento crónico en el eje SDF1/CXCR4 y/o por una falta de estímulo.

Como objetivo exploratorio, evaluamos otras moléculas implicadas en los procesos de reparación endotelial como CD105 (Endogлина), marcador implicado en la angiogénesis, los procesos inflamatorios y en la formación de neovasos tumorales; Recientemente se ha sugerido que CD105 podría jugar un papel clave en el tratamiento de la enfermedad vascular como una posible diana terapéutica (Kapur et al., 2013). Determinamos que existe un aumento en la expresión de CD105 en los pacientes con un mayor periodo de evolución de la enfermedad cardiovascular, sin embargo, sin diferencias significativas

al comparar los grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos. Pensamos que los resultados descritos son debidos a que en ambos grupos de pacientes existe cierto grado de degeneración y remodelado anómalo de los vasos sanguíneos. Por otra parte, Blazquez-Medela y cols., al observar en pacientes diabéticos mayor expresión de Endoglina soluble, asociada a hipertensión y evidencias de macro y microangiopatía crónica (Blazquez-Medela et al., 2010) lo han propuesto como un indicador de disfunción endotelial y daño cardiovascular. Sin embargo, en el presente estudio no determinamos los niveles de Endoglina soluble, ya que aún existe controversia respecto a la isoforma (L o S) de endoglina que se debe determinar, ya que consideramos que dado que la isoforma S puede ser modificada por la ingesta de estatinas se debería realizar un análisis más exhaustivo y comparativos de pacientes sin uso de éste fármaco para determinar la participación real de las 2 isoformas de Endoglina en la enfermedad cardiovascular.

Posteriormente, evaluamos el papel del factor de transcripción Ets-2. Ets-2 es un factor implicado en la patología cardiovascular y recientemente se ha observado su implicación en la regulación del miR-126 (Jansen et al., 2014; Wei et al., 2013), el cual se ha postulado como un novedoso biomarcador de la presencia de eventos cardiovasculares o disfunción endotelial que podría mediar la regulación de SDF1 (CXCL12)/CXCR4, a través de la liberación de microvesículas de las células endoteliales (cuerpos apoptóticos-vía miRNA-126); pero es importante considerar que su determinación es complicada y no está adecuadamente estandarizada. Establecidas estas consideraciones, nos centramos en el estudio del factor de transcripción Ets-2, por lo que al observar una menor expresión de Ets-2 en los pacientes diabéticos en comparación con los no diabéticos, apoyaría la hipótesis planteada inicialmente en modelos de estudio en los cuales la expresión de ETS se veía alterada por la presencia de diabetes en los cultivos de EPCs tratados con glucosa (15mM) (Seeger et al., 2009).

Sin embargo, al evaluar la respuesta de SDF1, la interacción de los factores de riesgo conocidos y la expresión de Ets-2 y CXCR4, observamos que existe una correlación inversa con la expresión de Ets-2 y por el contrario, una correlación directa con la expresión de CXCR4. Es posible plantear la

hipótesis de que en los pacientes con DM tipo 2 la respuesta a la isquemia que hemos observado de forma tardía, sea en parte debida a una desregulación en la vía de señalización de Ets-2- miRNA-126 después de la lesión isquémica, y por lo tanto, el efecto de regulación positiva de miRNA-126 sobre SDF1 no sería el óptimo y no habría aumento de SDF1- α o CXCL12 lesional y la movilización de células progenitoras de reparación endotelial no se llevaría a cabo o solo sería de forma pausada. Este es el primer estudio que muestra una disminución en expresión de Ets-2 en EPCs circulantes de pacientes diabéticos y su relación con la enfermedad cardiovascular, sin embargo, estos datos deben ser interpretados con cautela puesto que es necesario realizar más estudios que confirmen nuestra hipótesis.

Como ya se mencionó en la introducción, se ha planteado la idea de que al estimular las EPCs con terapia farmacológica, contribuirían a revertir la disfunción observada. Recientemente, se ha especulado acerca del papel de los Inhibidores de la DPP-4, ya que podrían mejorar el reclutamiento de las EPCs circulantes al inactivar a SDF-1 α (Brenner et al., 2014). Por lo anterior nos propusimos estudiar el efecto de Sitagliptina (Inhibidores de la DPP-4) sobre EPCs en cultivo. Así al estudiar el efecto de Sitagliptina en los cultivos de EPCs, observamos la formación de colonias en las tres concentraciones analizadas, de mayor tamaño en comparación con el control. Sin embargo, el aspecto celular observado con la concentración de 1 μ M de Sitagliptina presentaba cambios considerables en su aspecto, de redondeadas (monocíticas) a fusiformes con aumento de sus prolongaciones, pondría pensarse que esta definición morfológica, puede estar mediada por un aumento en la liberación de citocinas, con lo cual su adhesión (funcionalidad) se vería aumentada en respuesta al fármaco. Estos resultados podrían corresponderse con los mostrados por Matsubara y cols., en los cuales observaron una disminución de la inflamación, senescencia y apoptosis celular, con lo cual se revertiría la disfunción endotelial causada previamente (Matsubara et al., 2012), pero debemos considerar que aunque este es un modelo de estudio atractivo, es necesario que se puedan trasladar a la clínica por lo cual sería interesante saber si en pacientes con DM tipo 2

cuyo tratamiento se base solo en inhibidores de DPP4 como Sitagliptina, las EPCs presenten una mejor funcionalidad.

La importancia del efecto de Sitagliptina en el eje SDF1/CXCR4 radica en que de forma fisiológica la DPP4 regula su interacción. A diferencia del efecto estudiado previamente en modelos in vitro descritos previamente por Chua y cols., (EPCs de tejido adiposo con efecto a los 14 días) (Chua et al., 2013) y posteriormente en animales Brenner y cols., (aumento de SDF-1 α nativa después de 3 días) (Brenner et al., 2014); así como el efecto directo en pacientes en el ensayo clínico propuesto por Fadini y cols., (efecto significativo a las 4 semanas de tratamiento) , nosotros hemos observado que en los cultivos tratados con 1 μ M de Sitagliptina, el aumento en los niveles de SDF-1 α nativa y CXCR4 se presentó a las 24hrs y los resultados fueron similares con la concentración de 2 μ M a las 12 horas, juntos estos datos aunados a los resultados previos en los pacientes diabéticos estudiados, pensamos que un modelo de terapia basado en EPCs cultivadas previamente con sitagliptina con las concentraciones y tiempos antes mencionadas, ayudarían a corregir en parte el efecto de respuesta tardía a la isquemia en los pacientes diabéticos.

Al explorar el efecto de Sitagliptina en la expresión de Ets-2 y observar una disminución progresiva con el tiempo de exposición en las 3 concentraciones analizadas pensamos que esto sería consecuencia del aumento de CXCR4, ya que al estar activado, el efecto de Ets-2 y probablemente el de miR126, estarían suprimidos, lo que apoyaría en parte la hipótesis planteada anteriormente en los pacientes diabéticos, al estar disminuida o agotada la expresión de Ets-2, no veríamos el efecto positivo en CXCR4. Con lo cual, apoyaría nuestra hipótesis planteada de desregulación de Ets-2 en los pacientes diabéticos y probablemente la terapia con Sitagliptina ayudaría a revertir este efecto.

Debido a q se ha postulado que mirR126 media la regulación positiva de SDF1 derivado de los cuerpos apoptóticos, analizamos la expresión de p53, como una vía de estudio para determinar posibles alteraciones en el ciclo celular de las EPCs q influyeran en los resultados. Al no observar cambios respecto

al control a las 24 horas con 1 y 2 μM , nos haría suponer que el efecto que observamos previamente en los niveles de SDF-1 α , CXCR4 y Ets-2 es efecto de Sitagliptina, y no debido a la formación de cuerpos apoptóticos, pero dado que nuestros cultivos no han sido sometidos a estímulos nocivos, sería precipitado afirmarlo.

El siguiente objetivo planteado fue el estudio de adhesión de las células progenitoras endoteliales y su funcionalidad en arterias humanas desendotelizadas. Para ello, primero determinamos el efecto del eje SDF1/CXCR4 y el grado de hiperplasia neointimal en las arterias de los pacientes revascularizados, ya que en estudios recientes (modelo animal), se observó que CXCR4 es crucial para una adecuada reendotelización, ya que contribuye en la proliferación y movilización de la EPCs circulantes (Noels et al., 2014). Al analizar las arterias mamarias de los pacientes diabéticos y no diabéticos, observamos que efectivamente existen diferencias entre grupos, destacando una mayor área de la túnica media, así como mayor área de la neoíntima, aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos, esto podría explicarse por factores como el género, que en el caso de las mujeres, se ha demostrado que el diámetro de los vasos es menor; además, en estudios previos de nuestro grupo se ha evidenciado la idea de que existe un aumento en el número de células de la capa media muscular de las arterias de los pacientes diabéticos, debido a un desequilibrio entre la proliferación y la apoptosis condicionado por los estados de hiperglucemia (Ruiz et al., 2009).

Posteriormente, al analizar la expresión de SDF1 encontramos que la expresión es mayor en los pacientes con antecedente de infarto previo a los 7 días. Este aumento predominó en los pacientes diabéticos, sobre todo en el área de hiperplasia neointimal. Los resultados concuerdan con los resultados de Noels y cols., ya que evidenciaron que existe una disminución de SDF1(CXCL12) en el sitio de lesión endotelial de los ratones con deficiencia de CXCR4, postulando que estos hallazgos podrían contribuir de forma indirecta a una reducida movilización celular (Noels et al., 2014). Consecutivamente, al analizar la expresión del co-receptor CXCR4, observamos que ésta disminuido y que hay un aumento en la expresión en los

pacientes con antecedente de infarto (1 a 7 días y 8 a 21 días). No hubo diferencias significativas entre grupos de pacientes diabéticos y no diabéticos. Aun así, se observa que la expresión de CXCR4 es más intensa en la zona endotelial (pacientes no diabéticos), y posteriormente se distribuye en la capa media (ambos grupos). Juntos estos datos apoyarían en parte la hipótesis de que en los pacientes diabéticos, la respuesta de reparación endotelial se retrasa, con lo cual observamos de forma inicial una menor expresión de CXCR4, y secundariamente una menor expresión de SDF1 (CXCL12), enlenteciendo el proceso de reendotelización (menor movilización de EPCs), pero posteriormente a los 7 días, veríamos el aumento de SDF1 y la respuesta de movilización de EPCs.

El siguiente punto a evaluar, fue el efecto sobre la reactividad vascular de las EPCs en arterias humanas. Ya se ha señalado que las EPCs contribuyen a contrarrestar la disfunción del endotelial. Estudios previos en pacientes, relacionaron de forma directa el trofismo de las EPCs y la regulación del tono vascular, pero el efecto ha sido medido como relajación de la arteria braquial por ultrasonografía (Pirro et al., 2009). Otros modelos de estudio en animales, han evaluado el efecto de las EPCs en la reactividad vascular, incubando anillos arteriales con EPCs (12hrs), mostrando que la contracción y la relación eran menores después de la incubación con EPCs. Debido a estos antecedentes, implementamos un modelo de “adhesión por flujo”, que nos permitió evaluar la reactividad en arterias humanas antes y después del flujo de EPCs; además, pudimos evaluar el efecto de la adhesión en la liberación de citocinas (SDF1/CXCR4).

Estandarizamos el modelo de reactividad con 77 arterias mesentéricas de pacientes en quienes estaba indicado realizar cirugía abdominal. Las características generales de los pacientes (56,6 % hipertensos; 43% hipercolesterolemia; 29% DM tipo 2; 16% tabaquismo), son similares a las reportadas por otros estudios previos (Ng et al., 2011) y por nuestro grupo. Es importante destacar que la edad de los pacientes en nuestro estudio (61,3 vs 71,6 años) fue mayor, dificultando la realización de los experimentos. Al analizar las características de las arterias y los factores de riesgo en la respuesta de relajación, también observamos que

había una correlación inversa con la edad y el diámetro basal, y de forma directa con el % de contracción. Estos resultados son consistentes con los resultados de Navarro-Dorado y cols., en los cuales se observó que la relajación en arterias de pacientes de edades avanzadas (66-83 años) fue menor, ya que solo la entrada de calcio vía SOCC/ROCC y la vía de sensibilización al calcio no se vieron afectados por la edad (resultados pendientes de publicar).

Al evaluar de este modo el efecto de adhesión de las EPCs en la reactividad vascular de las arterias humanas, observamos una menor contracción siendo mayor el porcentaje de relajación. Los cambios no son estadísticamente significativos, pero debemos considerar que independientemente de factores limitantes antes mencionados como la edad y el pequeño tamaño de la muestra analizada, el efecto observado en la relajación de las arterias es importante. Aunque en este estudio no analizamos los mecanismos moleculares específicos por los cuales las EPCs restaurarían la regulación del tono vascular, una de las hipótesis planteadas sería la fuerza de roce que ejerce el flujo laminar de EPCs al circular por la arteria. Este mecanismo aumentaría la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (Swerdlow et al.) y de esta forma, permitiría la liberación inmediata de NO mediada por Ca^{+2} intracelular. Recientemente, Stachel y cols., evidenciaron que la activación de SDF1 dependiente de CXCR4, también permitía el desplazamiento del calcio del retículo endoplasmático al citoplasma, a través de un modelo de co-cultivo de células ováricas de hamster y EPCs embrionarias murinas marcadas con fluo-4Dye-CXCR4 que se incubaron con calcio (Stachel et al., 2013). La evaluación posterior que realizaron para evaluar el flujo de EPCs, solo fue enfocado a determinar la neovascularización y el reclutamiento de EPCs en el sitio de isquemia, mostrando resultados favorables con el plásmido de S1FG. Nosotros, al evaluar el efecto del flujo de EPCs en la expresión del eje SDF1/CXCR4 en las arterias. No determinamos cambios evidentes, pero si destaca la mayor expresión de CXCR4 en algunas células del endotelio. Con estos resultados, se podría suponer que la activación de CXCR4 al permitir la entrada de calcio, aumentaría la liberación de NO, con lo cual la vasodilatación aumenta por

efecto del flujo de las EPCs en las arterias humanas desendotelizadas. Este sería otro mecanismo por el cual las EPCs contribuyen a restituir la función endotelial.

La parte final de la presente tesis doctoral, fue el estudio del factor de transcripción Ets-2 en las EPCs circulantes. Dados los resultados previos en los pacientes con DM tipo 2 y enfermedad cardiovascular, y con el conocimiento previo de que las EPCs se liberan en respuesta a estímulos isquémicos, realizamos un análisis comparativo con pacientes con estenosis aórtica sin patología coronaria demostrada mediante angiografía, puesto que ambos grupos presentan cierto grado de isquemia tisular, la etiología es distinta.

Analizando las variables descritas, se observan diferencias estadísticamente significativas en la distribución por género, prevalencia de diabetes e hiperlipidemia, así como en los valores totales de glucosa, creatinina, leucocitos y monocitos. El primer dato citado, explica la mayor prevalencia de enfermedad cardiovascular en varones en comparación a la enfermedad valvular que se distribuye de manera equitativa entre ambos sexos.

Respecto a la mayor prevalencia de diabetes e hiperlipidemia, era un dato parcialmente esperado, ya que se buscó tener un grupo de pacientes sin la presencia de estas patologías, ya que podrían enmascarar los resultados observados. Las cifras superiores de leucocitos en los pacientes coronarios unido a la fuerte tendencia de aumento de las plaquetas en los mismos, podría explicarse por su papel como reactantes de fase aguda en los procesos inflamatorios.

Al determinar la expresión de Ets-2 por Western-blot, se ha observado una mayor expresión en las muestras de pacientes con patología coronaria frente a los pacientes con estenosis aórtica. Posteriormente, observamos que la expresión de Ets-2, disminuye progresivamente en los pacientes con mayor tiempo de evolución de la enfermedad cardiovascular en comparación con la enfermedad valvular. Resultados consistentes con los reportados previamente por Cheng y cols., en los cuales los niveles de Ets-2 se veían disminuidos en pacientes endarterectomizados con placas ateromatosas, y la

sobre expresión de Ets-2 en modelo murino, se asoció con la desestabilización de la placa (Cheng et al., 2011). Al trasladar estos datos a nuestro estudio, pensaríamos que el factor edad y la cronicidad de la patología cardiovascular serían fundamentales en los niveles de expresión de Ets-2. Para corroborar este hallazgo, los resultados de expresión de Ets-2 se analizaron en factor de la edad, el tiempo de evolución, la presencia de hiperlipidemia, y de forma exploratoria, la expresión de CD105 (endoglina); que como se mencionó anteriormente, se observa un aumento en la expresión en los pacientes con patología cardiovascular crónica (Blazquez-Medela et al., 2010). De esta forma tenemos que la expresión de Ets-2 se correlaciona de forma directa con la edad y los niveles de CD105 y de forma indirecta con el tiempo de evolución y la presencia de hiperlipidemia en los pacientes. Por lo tanto, los datos observados de menor expresión de Ets-2 observados por Chen y cols., corresponderían con los grupos de mayor tiempo de evolución con enfermedad cardiovascular crónica. Y justamente el punto de mayor expresión de Ets-2 observado en nuestro grupo, sería el momento de desestabilización de la placa en el modelo murino.

En virtud de lo anterior, se apoyaría la idea anteriormente planteada de que la menor expresión de Ets-2 altera la cascada de señalización de SDF1/CXCR4 en las EPCs, siendo dependiente de factores como la edad, el tiempo de evolución y la presencia de hiperlipidemias; que particularmente en el paciente con DM tipo 2 ocasiona mayor disfunción endotelial y se asocian con un mayor número de complicaciones y ECV.

Posteriormente, para intentar demostrar si existe relación entre la expresión reducida de Ets-2 y la alteración en el número y función de las EPCs, se ha inhibido in vitro la expresión de Ets-2 mediante siRNA en cultivos de EPCs. Observamos que la formación de UFCs tiende a reducirse en los cultivos sometidos a la inhibición de Ets-2. Estos resultados aún se encuentran limitados por el reducido tamaño muestral analizado hasta el momento y otro factor importante es la gran diferencia interindividual existente tanto en sujetos sanos como enfermos en cuanto a la formación de UFCs. Previamente, el grupo de Seeger y cols., observaron un aumento en el número de células que expresaban CD105 y CD144, en un modelo de

inhibición que incluía Ets-1 además de Ets-2, valorando la expresión a los 12 días de cultivo (Seeger et al., 2009). Nosotros observamos que el efecto de inhibir solo Ets-2 a los 7 días, aumenta la expresión de CD144, pero no de CD105. Respecto a la expresión de CXCR4, no observamos cambios significativos. Estos datos pueden sugerir que realmente existe una relación causa-efecto entre la expresión reducida de Ets-2 y la funcionalidad alterada de las EPCs en los pacientes con patología cardiovascular, pero son necesarios modelos de estudio que se asemejen aún más las condiciones fisiológicas en las cuales las EPCs se encuentran inmersas.

Finalmente, se ha postulado que el medio condicionado también juega un papel importante en la funcionalidad de las EPCs, lo que supondría una revolución terapéutica si se aplicasen factores que estimulen la función de las EPCs (Jiang et al., 2013). Al evaluar el efecto del medio condicionado de los cultivos inhibidos con SiRNA Ets-2, también observamos un menor número de UFC, así como menor expresión de CD105, CD144 y CXCR4. Estos datos podrían sugerir que el medio condicionado producto de los cultivos con EPCs, también mejorarían la calidad de las EPCs y éste podría infundirse para tratar a pacientes con patología cardiovascular. Sin embargo, los datos obtenidos podrían abrir una nueva línea de investigación, ya que si se confirmara con certeza que una de las causas de la depleción y alteración funcional de las EPCs en los pacientes con patología cardiovascular es la expresión reducida de Ets-2, y asimismo este hecho se relaciona con estadios avanzados de la enfermedad, podría emplearse este parámetro como factor diagnóstico y de predicción pronóstica mediante su determinación en sangre periférica. Éste es un procedimiento de laboratorio no invasivo, que permitiría orientar secundariamente la mejor estrategia terapéutica para los pacientes en función de los resultados obtenidos.

V. CONCLUSIONES

1. En los pacientes con DM tipo 2, debido a la isquemia silente y crónica, la respuesta de liberación de EPCs por efecto del eje SDF-1 α y su co-receptor CXCR4, tiene un efecto tardío en los procesos de reparación endotelial, asociado a la fluctuación en los niveles de glucosa y bajos niveles de HDL.
2. La funcionalidad deficiente de las EPCs circulantes, se asocia con la disminución de la expresión del factor de transcripción Ets-2 en estadios avanzados de la enfermedad cardiovascular en pacientes con DM tipo 2. Ets-2 podría ser un marcador temprano de inestabilidad cardiovascular asociado a estados de hiperlipidemia.
3. La terapia con células progenitoras endoteliales en arterias humanas desendotelizadas, tienen un efecto positivo en la relajación, cuyo mecanismo propuesto depende de la activación de CXCR4, el cual permitiría la entrada de calcio, aumentando de forma inmediata la liberación de NO.
4. La terapia con Sitagliptina en las EPCs en cultivo, ayudaría revertir la funcionalidad deficiente de las EPCs, sobre todo en pacientes con DM tipo 2.

VI. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abe Y, Ozaki Y, Kasuya J, Yamamoto K, Ando J, Sudo R, Ikeda M y Tanishita K (2013) Endothelial progenitor cells promote directional three-dimensional endothelial network formation by secreting vascular endothelial growth factor. *PLoS One* 8:e82085.
- Abu-Hamdah R, Rabiee A, Meneilly GS, Shannon RP, Andersen DK y Elahi D (2009) Clinical review: The extrapancreatic effects of glucagon-like peptide-1 and related peptides. *J Clin Endocrinol Metab* 94:1843-1852.
- ADA (2010) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33 Suppl 1:S62-69.
- Ahmad FK, He Z y King GL (2005) Molecular targets of diabetic cardiovascular complications. *Curr Drug Targets* 6:487-494.
- Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM y Dimmeler S (2003) Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9:1370-1376.
- Akhtar S, Gremse F, Kiessling F, Weber C y Schober A (2013) CXCL12 promotes the stabilization of atherosclerotic lesions mediated by smooth muscle progenitor cells in Apoe-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33:679-686.
- Albiero M, Avogaro A y Fadini GP (2013) Restoring stem cell mobilization to promote vascular repair in diabetes. *Vascul Pharmacol* 58:253-258.
- Antonio N, Fernandes R, Soares A, Soares F, Lopes A, Carvalheiro T, Paiva A, Pego GM, Providencia LA, Goncalves L y Ribeiro CF (2014a) Reduced levels of circulating endothelial progenitor cells in acute myocardial infarction patients with diabetes or pre-diabetes: accompanying the glycemic continuum. *Cardiovasc Diabetol* 13:101.
- Antonio N, Soares A, Fernandes R, Soares F, Lopes A, Carvalheiro T, Paiva A, Providencia LA, Goncalves L y Fontes Ribeiro C (2014b) Endothelial progenitor cells in diabetic patients with myocardial infarction - can statins improve their function? *Eur J Pharmacol* 741:25-36.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Wagner M y Isner JM (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85:221-228.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G y Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967.
- Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S y Zeiher

AM (2006) Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 355:1222-1232.

Augustin HG, Kozian DH y Johnson RC (1994) Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* 16:901-906.

Avogaro A, Albiero M, Menegazzo L, de Kreutzenberg S y Fadini GP (2011) Endothelial dysfunction in diabetes: the role of reparatory mechanisms. *Diabetes Care* 34 Suppl 2:S285-290.

Balaji S, King A, Crombleholme TM y Keswani SG (2013) The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2:283-295.

Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefer J, Bolz SS, Drucker DJ y Husain M (2008) Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation* 117:2340-2350.

Beeres SL, Bax JJ, Dibbets-Schneider P, Stokkel MP, Fibbe WE, van der Wall EE, Schaliy MJ y Atsma DE (2007) Intramyocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with chronic myocardial infarction and severe left ventricular dysfunction. *Am J Cardiol* 100:1094-1098.

Bergman AJ, Stevens C, Zhou Y, Yi B, Laethem M, De Smet M, Snyder K, Hilliard D, Tanaka W, Zeng W, Tanen M, Wang AQ, Chen L, Winchell G, Davies MJ, Ramael S, Wagner JA y Herman GA (2006) Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of multiple oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor: a double-blind, randomized, placebo-controlled study in healthy male volunteers. *Clin Ther* 28:55-72.

Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, Jang HK y Kim BS (2014) Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Mol Ther* 22:862-872.

Blazquez-Medela AM, Garcia-Ortiz L, Gomez-Marcos MA, Recio-Rodriguez JI, Sanchez-Rodriguez A, Lopez-Novoa JM y Martinez-Salgado C (2010) Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med* 8:86.

Blum A (2014) HMG-CoA reductase inhibitors (statins), inflammation, and endothelial progenitor cells-New mechanistic insights of atherosclerosis. *Biofactors* 40:295-302.

Blumenthal SG, Aichele G, Wirth T, Czernilofsky AP, Nordheim A y Dittmer J (1999) Regulation of the human interleukin-5 promoter by Ets transcription factors. Ets1 and Ets2, but not Elf-1, cooperate with GATA3 and HTLV-I Tax1. *J Biol Chem* 274:12910-12916.

Brenner C, Krankel N, Kuhlenthal S, Israel L, Remm F, Fischer C, Herbach N, Speer T, Grabmaier U, Laskowski A, Gross L, Theiss H, Wanke R, Landmesser U y Franz WM (2014) Short-term inhibition of DPP-4 enhances endothelial regeneration after acute arterial injury via enhanced recruitment of circulating progenitor cells. *Int J Cardiol* 177:266-275.

Briasoulis A, Tousoulis D, Antoniadis C, Papageorgiou N y Stefanadis C (2011) The role of endothelial progenitor cells in vascular repair after arterial injury and atherosclerotic plaque development. *Cardiovasc Ther* 29:125-139.

Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D y Camussi G (2005) Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol* 166:545-555.

Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP y Gurtner GC (2004) Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10:858-864.

Colombo E, Marconi C, Taddeo A, Cappelletti M, Villa ML, Marzorati M, Porcelli S, Vezzoli A y Della Bella S (2012) Fast reduction of peripheral blood endothelial progenitor cells in healthy humans exposed to acute systemic hypoxia. *J Physiol* 590:519-532.

Consoli C, Gatta L, Iellamo F, Molinari F, Rosano GM y Marlier LN (2013) Severity of left ventricular dysfunction in heart failure patients affects the degree of serum-induced cardiomyocyte apoptosis. Importance of inflammatory response and metabolism. *Int J Cardiol* 167:2859-2866.

Cheng C, Tempel D, Den Dekker WK, Haasdijk R, Chrifi I, Bos FL, Wagtmans K, van de Kamp EH, Blondin L, Biessen EA, Moll F, Pasterkamp G, Serruys PW, Schulte-Merker S y Duckers HJ (2011) Ets2 determines the inflammatory state of endothelial cells in advanced atherosclerotic lesions. *Circ Res* 109:382-395.

Christopherson KW, 2nd, Hangoc G, Mantel CR y Broxmeyer HE (2004) Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science* 305:1000-1003.

Chua S, Sheu JJ, Chen YL, Chang LT, Sun CK, Leu S, Sung HC, Tsai TH, Chung SY, Yeh KH, Cho CL, Kao YH y Yip HK (2013) Sitagliptin therapy enhances the number of circulating angiogenic cells and angiogenesis-evaluations in vitro and in the rat critical limb ischemia model. *Cytotherapy* 15:1148-1163.

De Falco E, Porcelli D, Torella AR, Straino S, Iachininoto MG, Orlandi A, Truffa S, Biglioli P, Napolitano M, Capogrossi MC y Pesce M (2004) SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood* 104:3472-3482.

Deacon CF y Ahren B (2011) Physiology of incretins in health and disease. *Rev Diabet Stud* 8:293-306.

Dejana E, Taddei A y Randi AM (2007) Foxs and Ets in the transcriptional regulation of endothelial cell differentiation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1775:298-312.

Desouza CV (2013) Does drug therapy reverse endothelial progenitor cell dysfunction in diabetes? *J Diabetes Complications* 27:519-525.

Di Santo S, Yang Z, Wyler von Ballmoos M, Voelzmann J, Diehm N, Baumgartner I y Kalka C (2009) Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS One* 4:e5643.

Dicker D (2011) DPP-4 inhibitors: impact on glycemic control and cardiovascular risk factors. *Diabetes Care* 34 Suppl 2:S276-278.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R y Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399:601-605.

Doring Y, Pawig L, Weber C y Noels H (2014) The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Front Physiol* 5:212.

Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegue E, Song H, Vandenberg S, Johnson RS, Werb Z y Bergers G (2008) HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 13:206-220.

Dubois C, Liu X, Claus P, Marsboom G, Pokreisz P, Vandenwijngaert S, Depelteau H, Streb W, Chaothawee L, Maes F, Gheysens O, Debyser Z, Gillijns H, Pellens M, Vandendriessche T, Chuah M, Collen D, Verbeken E, Belmans A, Van de Werf F, Bogaert J y Janssens S (2010) Differential effects of progenitor cell populations on left ventricular remodeling and myocardial neovascularization after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 55:2232-2243.

Fadini GP (2014) A reappraisal of the role of circulating (progenitor) cells in the pathobiology of diabetic complications. *Diabetologia* 57:4-15.

Fadini GP y Avogaro A (2013) Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and vascular repair by mobilization of endogenous stem cells in diabetes and beyond. *Atherosclerosis* 229:23-29.

Fadini GP, Boscaro E, Albiero M, Menegazzo L, Frison V, de Kreutzenberg S, Agostini C, Tiengo A y Avogaro A (2010) The oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin increases circulating endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes: possible role of stromal-derived factor-1alpha. *Diabetes Care* 33:1607-1609.

Fadini GP, Grego F, Menegolo M, Agostini C y Avogaro A (2012a) Arterio-venous gradients of endothelial progenitor cells reveal a complex kinetics in human limb ischemia. *Clin Hemorheol Microcirc* 50:293-300.

Fadini GP, Losordo D y Dimmeler S (2012b) Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res* 110:624-637.

Fadini GP, Maruyama S, Ozaki T, Taguchi A, Meigs J, Dimmeler S, Zeiher AM, de Kreutzenberg S, Avogaro A, Nickenig G, Schmidt-Lucke C y Werner N (2012c) Circulating progenitor cell count for cardiovascular risk stratification: a pooled analysis. *PLoS One* 5:e11488.

Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F, Menegolo M, de Kreutzenberg SV, Tiengo A, Agostini C y Avogaro A (2005) Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 45:1449-1457.

Felix-Redondo FJ, Grau M, Baena-Diez JM, Degano IR, de Leon AC, Guembe MJ, Alzamora MT, Vega-Alonso T, Robles NR, Ortiz H, Rigo F, Mayoral-Sanchez E, Tormo MJ, Segura-Fragoso A y Fernandez-Berges D (2013) Prevalence of obesity and associated cardiovascular risk: the DARIOS study. *BMC Public Health* 13:542.

Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, Fernandez ME, Penarrubia MJ, de la Fuente L, Gomez-Bueno M, Cantalapiedra A, Fernandez J, Gutierrez O, Sanchez PL, Hernandez C, Sanz R, Garcia-Sancho J y Sanchez A (2004) Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 95:742-748.

Ferraro F, Lympieri S, Mendez-Ferrer S, Saez B, Spencer JA, Yeap BY, Masselli E, Graiani G, Prezioso L, Rizzini EL, Mangoni M, Rizzoli V, Sykes SM, Lin CP, Frenette PS, Quaini F y Scadden DT (2011) Diabetes impairs hematopoietic stem cell mobilization by altering niche function. *Sci Transl Med* 3:104ra101.

Folkman J, Merler E, Abernathy C y Williams G (1971) Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 133:275-288.

Garg R, Tellez A, Alviar C, Granada J, Kleiman NS y Lev EI (2008). The effect of percutaneous coronary intervention on inflammatory response and endothelial progenitor cell recruitment. *Catheter Cardiovasc Interv* 72:205-209.

George F, Brisson C, Poncelet P, Laurent JC, Massot O, Arnoux D, Ambrosi P, Klein-Soyer C, Cazenave JP y Sampol J (1992) Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thromb Haemost* 67:147-153.

Goncalves A, Leal E, Paiva A, Teixeira Lemos E, Teixeira F, Ribeiro CF, Reis F, Ambrosio AF y Fernandes R (2012) Protective effects of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin in the blood-retinal barrier in a type 2 diabetes animal model. *Diabetes Obes Metab* 14:454-463.

Harris TA, Yamakuchi M, Kondo M, Oettgen P y Lowenstein CJ (2010) Ets-1 and Ets-2 regulate the expression of microRNA-126 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1990-1997.

Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z y Rafii S (2002) Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109:625-637.

Henrich D, Hahn P, Wahl M, Wilhelm K, Dernbach E, Dimmeler S y Marzi I (2004) Serum derived from multiple trauma patients promotes the differentiation of endothelial progenitor cells in vitro: possible role of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor165. *Shock* 21:13-16.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA y Finkel T (2003) Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348:593-600.

Hopman RK y DiPersio JF (2014) Advances in stem cell mobilization. *Blood Rev* 28:31-40.

Hristov M, Fach C, Becker C, Heussen N, Liehn EA, Blindt R, Hanrath P y Weber C (2007) Reduced numbers of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease associated with long-term statin treatment. *Atherosclerosis* 192:413-420.

Hristov M y Weber C (2004). Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance, in *J Cell Mol Med* pp 498-508.

Hu X, Dai S, Wu WJ, Tan W, Zhu X, Mu J, Guo Y, Bolli R y Rokosh G (2007) Stromal cell derived factor-1 alpha confers protection against myocardial ischemia/reperfusion injury: role of the cardiac stromal cell derived factor-1 alpha CXCR4 axis. *Circulation* 116:654-663.

Huang CY, Shih CM, Tsao NW, Lin YW, Huang PH, Wu SC, Lee AW, Kao YT, Chang NC, Nakagami H, Morishita R, Ou KL, Hou WC, Lin CY, Shyu KG y Lin FY (2012) Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor improves neovascularization by increasing circulating endothelial progenitor cells. *Br J Pharmacol* 167:1506-1519.

Hueper W (1932) Capillary-like formations in tissue cultures of leukocytes. *Arch Exp Zellforsch* 12:17.

Ingram DA, Caplice NM y Yoder MC (2005) Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 106:1525-1531.

Iqbal J, Zhang YJ, Holmes DR, Morice MC, Mack MJ, Kappetein AP, Feldman T, Stahle E, Escaned J, Banning AP, Gunn JP, Colombo A, Steyerberg EW,

Mohr FW y Serruys PW (2015) Optimal Medical Therapy Improves Clinical Outcomes in Patients Undergoing Revascularization With Percutaneous Coronary Intervention or Coronary Artery Bypass Grafting: Insights From the Synergy Between Percutaneous Coronary Intervention With TAXUS and Cardiac Surgery (SYNTAX) Trial at the 5-Year Follow-Up. *Circulation* 131:1269-1277.

Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Matsushima K, Mukaida N y Kondo T (2012) Pivotal role of the CCL5/CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing. *J Clin Invest* 122:711-721.

Islas JF, Liu Y, Weng KC, Robertson MJ, Zhang S, Prejusa A, Harger J, Tikhomirova D, Chopra M, Iyer D, Mercola M, Oshima RG, Willerson JT, Potaman VN y Schwartz RJ (2012) Transcription factors ETS2 and MESP1 transdifferentiate human dermal fibroblasts into cardiac progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:13016-13021.

Iwami Y, Masuda H y Asahara T (2004). Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. *J Cell Mol Med* 8:488-497.

Jansen F, Yang X, Proebsting S, Hoelscher M, Przybilla D, Baumann K, Schmitz T, Dolf A, Endl E, Franklin BS, Sinning JM, Vasa-Nicotera M, Nickenig G y Werner N (2014) MicroRNA expression in circulating microvesicles predicts cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *J Am Heart Assoc* 3:e001249.

Jiang DM, Han J, Zhu JH, Fu GS y Zhou BQ (2013) Paracrine effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cells: cyclooxygenase-2/prostacyclin pathway in pulmonary arterial hypertension. *PLoS One* 8:e79215.

Jimenez-Quevedo P, Gonzalez-Ferrer JJ, Sabate M, Garcia-Moll X, Delgado-Bolton R, Llorente L, Bernardo E, Ortega-Pozzi A, Hernandez-Antolin R, Alfonso F, Gonzalo N, Escaned J, Banuelos C, Regueiro A, Marin P, Fernandez-Ortiz A, Neves BD, Del Trigo M, Fernandez C, Tejerina T, Redondo S, Garcia E y Macaya C (2014) Selected CD133(+) progenitor cells to promote angiogenesis in patients with refractory angina: final results of the PROGENITOR randomized trial. *Circ Res* 115:950-960.

Jin DK, Shido K, Kopp HG, Petit I, Shmelkov SV, Young LM, Hooper AT, Amano H, Avecilla ST, Heissig B, Hattori K, Zhang F, Hicklin DJ, Wu Y, Zhu Z, Dunn A, Salari H, Werb Z, Hackett NR, Crystal RG, Lyden D y Rafii S (2006) Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes. *Nat Med* 12:557-567.

Joseph JJ y Golden SH (2014) Type 2 diabetes and cardiovascular disease: what next? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 21:109-120.

Jujo K, Li M y Losordo DW (2008) Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 45:530-544.

Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM y Asahara T (2000) Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3422-3427.

Kapur NK, Morine KJ y Letarte M (2013) Endoglin: a critical mediator of cardiovascular health. *Vasc Health Risk Manag* 9:195-206.

Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM y Asahara T (2001) Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 103:634-637.

Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, Murayama T, Oyamada A, Silver M, Hulbert C, Gavin M, Hanley A, Ma H, Kearney M, Zak V, Asahara T y Losordo DW (2006) CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation* 114:2163-2169.

King TF y McDermott JH (2014) Endothelial progenitor cells and cardiovascular disease. *J Stem Cells* 9:93-106.

Kitada M, Zhang Z, Mima A y King GL (2010) Molecular mechanisms of diabetic vascular complications. *J Diabetes Investig* 1:77-89.

Kurlansky P, Herbert M, Prince S y Mack MJ (2015) Improved long-term survival for diabetic patients with surgical versus interventional revascularization. *Ann Thorac Surg* 99:1298-1305.

Li D, Yan D, Liu W, Li M, Yu J, Li Y, Qu Z y Ruan Q (2011) Foxc2 overexpression enhances benefit of endothelial progenitor cells for inhibiting neointimal formation by promoting CXCR4-dependent homing. *J Vasc Surg* 53:1668-1678.

Li H, Zhang X, Guan X, Cui X, Wang Y, Chu H y Cheng M (2012) Advanced glycation end products impair the migration, adhesion and secretion potentials of late endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Diabetol* 11:46.

Losordo DW, Henry TD, Davidson C, Sup Lee J, Costa MA, Bass T, Mendelsohn F, Fortuin FD, Pepine CJ, Traverse JH, Amrani D, Ewenstein BM, Riedel N, Story K, Barker K, Povsic TJ, Harrington RA y Schatz RA (2011) Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina. *Circ Res* 109:428-436.

Losordo DW, Schatz RA, White CJ, Udelson JE, Veereshwarayya V, Durgin M, Poh KK, Weinstein R, Kearney M, Chaudhry M, Burg A, Eaton L, Heyd L, Thorne T, Shturman L, Hoffmeister P, Story K, Zak V, Dowling D, Traverse JH, Olson RE, Flanagan J, Sodano D, Murayama T, Kawamoto A, Kusano KF, Wollins J, Welt F, Shah P, Soukas P, Asahara T y Henry TD (2007) Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation* 115:3165-3172.

Lunde K, Solheim S, Forfang K, Arnesen H, Brinch L, Bjornerheim R, Ragnarsson A, Egeland T, Endresen K, Ilebekk A, Mangschau A y Aakhus S (2008) Anterior myocardial infarction with acute percutaneous coronary intervention and intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells: safety, clinical outcome, and serial changes in left ventricular function during 12-months' follow-up. *J Am Coll Cardiol* 51:674-676.

Martinez-Hervas S, Carmena R, Ascaso JF, Real JT, Masana L, Catala M, Vendrell J, Vazquez JA, Valdes S, Urrutia I, Soriguer F, Serrano-Rios M, Rojo-Martinez G, Pascual-Manich G, Ortega E, Mora-Peces I, Menendez E, Martinez-Larrad MT, Lopez-Alba A, Gomis R, Goday A, Girbes J, Gaztambide S, Franch J, Delgado E, Castell C, Castano L, Casamitjana R, Calle-Pascual A y Bordiu E (2014) Prevalence of plasma lipid abnormalities and its association with glucose metabolism in Spain: the di@bet.es study. *Clin Investig Arterioscler* 26:107-114.

Masuda H, Tanaka R, Fujimura S, Ishikawa M, Akimaru H, Shizuno T, Sato A, Okada Y, Iida Y, Itoh J, Itoh Y, Kamiguchi H, Kawamoto A y Asahara T (2014) Vasculogenic conditioning of peripheral blood mononuclear cells promotes endothelial progenitor cell expansion and phenotype transition of anti-inflammatory macrophage and T lymphocyte to cells with regenerative potential. *J Am Heart Assoc* 3:e000743.

Matsubara J, Sugiyama S, Sugamura K, Nakamura T, Fujiwara Y, Akiyama E, Kurokawa H, Nozaki T, Ohba K, Konishi M, Maeda H, Izumiya Y, Kaikita K, Sumida H, Jinnouchi H, Matsui K, Kim-Mitsuyama S, Takeya M y Ogawa H (2012) A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, des-fluoro-sitagliptin, improves endothelial function and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. *J Am Coll Cardiol* 59:265-276.

Meier JJ y Nauck MA (2010) Is the diminished incretin effect in type 2 diabetes just an epi-phenomenon of impaired beta-cell function? *Diabetes* 59:1117-1125.

Menegazzo L, Albiero M, Avogaro A y Fadini GP (2012) Endothelial progenitor cells in diabetes mellitus. *Biofactors* 38:194-202.

Monteiro R, Teixeira D y Calhau C (2014) Estrogen signaling in metabolic inflammation. *Mediators Inflamm* 2014:615917.

Muscogiuri G, Cignarelli A, Giorgino F, Prodrum F, Santi D, Tirabassi G, Balercia G, Modica R, Faggiano A y Colao A (2014) GLP-1: benefits beyond pancreas. *J Endocrinol Invest*.

Ng FL, Davis AJ, Jepps TA, Harhun MI, Yeung SY, Wan A, Reddy M, Melville D, Nardi A, Khong TK y Greenwood IA (2011) Expression and function of the K⁺ channel KCNQ genes in human arteries. *Br J Pharmacol* 162:42-53.

Noels H, Zhou B, Tilstam PV, Theelen W, Li X, Pawig L, Schmitz C, Akhtar S, Simsekylmaz S, Shagdarsuren E, Schober A, Adams RH, Bernhagen J, Liehn

- EA, Doring Y y Weber C (2014) Deficiency of endothelial CXCR4 reduces reendothelialization and enhances neointimal hyperplasia after vascular injury in atherosclerosis-prone mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:1209-1220.
- Nowak G, Karrar A, Holmen C, Nava S, Uzunel M, Hultenby K y Sumitran-Holgersson S (2004) Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 or Tie-2 on peripheral blood cells defines functionally competent cell populations capable of reendothelialization. *Circulation* 110:3699-3707.
- Oettgen P (2006) Regulation of vascular inflammation and remodeling by ETS factors. *Circ Res* 99:1159-1166.
- Parker RC (1933) The Development of Organized Vessels in Cultures of Blood Cells. *Science* 77:544-546.
- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA y Rafii S (2000) Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95:952-958.
- Pirro M, Schillaci G, Romagno PF, Mannarino MR, Bagaglia F, Razzi R, Pasqualini L, Vaudo G y Mannarino E (2009) Influence of short-term rosuvastatin therapy on endothelial progenitor cells and endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 14:14-21.
- Plosker GL (2014) Sitagliptin: a review of its use in patients with type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 74:223-242.
- Porat Y, Porozov S, Belkin D, Shimoni D, Fisher Y, Belleli A, Czeiger D, Silverman WF, Belkin M, Battler A, Fulga V y Savion N (2006) Isolation of an adult blood-derived progenitor cell population capable of differentiation into angiogenic, myocardial and neural lineages. *Br J Haematol* 135:703-714.
- Rafii S y Lyden D (2003) Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9:702-712.
- Rajagopalan L y Rajarathnam K (2006) Structural basis of chemokine receptor function--a model for binding affinity and ligand selectivity. *Biosci Rep* 26:325-339.
- Randi AM, Sperone A, Dryden NH y Birdsey GM (2009) Regulation of angiogenesis by ETS transcription factors. *Biochem Soc Trans* 37:1248-1253.
- Rath D, Chatterjee M, Borst O, Muller K, Stellos K, Mack AF, Bongartz A, Bigalke B, Langer H, Schwab M, Gawaz M y Geisler T (2014) Expression of stromal cell-derived factor-1 receptors CXCR4 and CXCR7 on circulating platelets of patients with acute coronary syndrome and association with left ventricular functional recovery. *Eur Heart J* 35:386-394.
- Redondo S, Gonzalez-Rocafor A, Navarro-Dorado J, Ramajo M, Hristov M, Gordillo-Moscoso A, Reguillo F, Carnero M, Martinez-Gonzalez J, Rodriguez

- E, Weber C y Tejerina T (2012) Decreased pre-surgical CD34+/CD144+ cell number in patients undergoing coronary artery bypass grafting compared to coronary artery disease-free valvular patients. *J Cardiothorac Surg* 7:2.
- Redondo S, Ruiz E, Gordillo-Moscoso A, Navarro-Dorado J, Ramajo M, Carnero M, Reguillo F, Rodriguez E y Tejerina T (2010) Role of TGF-beta1 and MAP kinases in the antiproliferative effect of aspirin in human vascular smooth muscle cells. *PLoS One* 5:e9800.
- Redondo S, Santos-Gallego CG y Tejerina T (2007) TGF-beta1: a novel target for cardiovascular pharmacology. *Cytokine Growth Factor Rev* 18:279-286.
- Rennert RC, Sorkin M, Garg RK y Gurtner GC (2012) Stem cell recruitment after injury: lessons for regenerative medicine. *Regen Med* 7:833-850.
- Resch T, Pircher A, Kahler CM, Pratschke J y Hilbe W (2012) Endothelial progenitor cells: current issues on characterization and challenging clinical applications. *Stem Cell Rev* 8:926-939.
- Ribatti D, Vacca A, Nico B, Ria R y Dammacco F (2002) Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways. *Curr Mol Med* 2:537-543.
- Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126.
- Roubille F, Prunier F, Barrere-Lemaire S, Leclercq F, Piot C, Kritikou EA, Rheaume E, Busseuil D y Tardif JC (2013) What is the role of erythropoietin in acute myocardial infarct? Bridging the gap between experimental models and clinical trials. *Cardiovasc Drugs Ther* 27:315-331.
- Rudini N, Felici A, Giampietro C, Lampugnani M, Corada M, Swirsding K, Garre M, Liebner S, Letarte M, ten Dijke P y Dejana E (2008) VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *EMBO J* 27:993-1004.
- Ruiz E, Redondo S, Gordillo-Moscoso A, Rodriguez E, Reguillo F, Martinez-Gonzalez J y Tejerina T (2009) EPC adhesion to arteries from diabetic and non-diabetic patients: effect of pioglitazone. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:3608-3618.
- Rustemeyer P, Witkowski W, Greve B y Stehling M (2007) Flow-cytometric identification, enumeration, purification, and expansion of CD133+ and VEGF-R2+ endothelial progenitor cells from peripheral blood. *J Immunoassay Immunochem* 28:13-23.
- Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwer CD, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK y Danesh J (2010) Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet* 375:2215-2222.

Saxena A, Fish JE, White MD, Yu S, Smyth JW, Shaw RM, DiMaio JM y Srivastava D (2008) Stromal cell-derived factor-1alpha is cardioprotective after myocardial infarction. *Circulation* 117:2224-2231.

Scott SM, Barth MG, Gaddy LR y Ahl ET, Jr. (1994) The role of circulating cells in the healing of vascular prostheses. *J Vasc Surg* 19:585-593.

Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S y Zeiher AM (2004) Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 44:1690-1699.

Schirra J, Sturm K, Leicht P, Arnold R, Goke B y Katschinski M (1998) Exendin(9-39)amide is an antagonist of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in humans. *J Clin Invest* 101:1421-1430.

Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM, Bradley NJ, Skene AI, Davies AJ, Greaves MF, Denekamp J y Ruiter DJ (1990) Leukocyte antigen CD34 is expressed by a subset of cultured endothelial cells and on endothelial abluminal microprocesses in the tumor stroma. *Lab Invest* 62:690-696.

Schmeisser A, Garlichts CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, Strasser RH y Daniel WG (2001) Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* 49:671-680.

Schmidt DE, Manca M y Hoefer IE (2015) Circulating endothelial cells in coronary artery disease and acute coronary syndrome. *Trends Cardiovasc Med*.

Seeger FH, Chen L, Spyridopoulos I, Altschmied J, Aicher A y Haendeler J (2009) Downregulation of ETS rescues diabetes-induced reduction of endothelial progenitor cells. *PLoS One* 4:e4529.

Shah Z, Pineda C, Kampfrath T, Maiseyeu A, Ying Z, Racoma I, Deiluiis J, Xu X, Sun Q, Moffatt-Bruce S, Villamena F y Rajagopalan S (2011) Acute DPP-4 inhibition modulates vascular tone through GLP-1 independent pathways. *Vascul Pharmacol* 55:2-9.

Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF y Hammond WP (1998) Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92:362-367.

Sidhu MS y Boden WE (2015). The continued importance of optimal medical therapy with or without revascularization in diabetic patients with coronary artery disease. *Trends Cardiovasc Med*.

Sivertsen J, Rosenmeier J, Holst JJ y Vilsboll T (2012) The effect of glucagon-like peptide 1 on cardiovascular risk. *Nat Rev Cardiol* 9:209-222.

Stachel G, Trenkwalder T, Gotz F, El Aouni C, Muenchmeier N, Pfosser A, Nussbaum C, Sperandio M, Hatzopoulos AK, Hinkel R, Nelson PJ y Kupatt C (2013) SDF-1 fused to a fractalkine stalk and a GPI anchor enables functional neovascularization. *Stem Cells* 31:1795-1805.

Steinmetz M, Nickenig G y Werner N (2010) Endothelial-regenerating cells: an expanding universe. *Hypertension* 55:593-599.

Stellos K, Langer H, Daub K, Schoenberger T, Gauss A, Geisler T, Bigalke B, Mueller I, Schumm M, Schaefer I, Seizer P, Kraemer BF, Siegel-Axel D, May AE, Lindemann S y Gawaz M (2008) Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation* 117:206-215.

Stellos K, Rahmann A, Kiliass A, Ruf M, Sopova K, Stamatelopoulos K, Jorbenadze R, Weretka S, Geisler T, Gawaz M, Weig HJ y Bigalke B (2012) Expression of platelet-bound stromal cell-derived factor-1 in patients with non-valvular atrial fibrillation and ischemic heart disease. *J Thromb Haemost* 10:49-55.

Stump MM, Jordan GL, Jr., DeBakey ME y Halpert B (1963) Endothelium Grown from Circulating Blood on Isolated Intravascular Dacron Hub. *Am J Pathol* 43:361-367.

Swerdlow DI, Preiss D, Kuchenbaecker KB, Holmes MV, Engmann JE, Shah T, Sofat R, Stender S, Johnson PC, Scott RA, Leusink M, Verweij N, Sharp SJ, Guo Y, Giambartolomei C, Chung C, Peasey A, Amuzu A, Li K, Palmen J, Howard P, Cooper JA, Drenos F, Li YR, Lowe G, Gallacher J, Stewart MC, Tzoulaki I, Buxbaum SG, van der AD, Forouhi NG, Onland-Moret NC, van der Schouw YT, Schnabel RB, Hubacek JA, Kubinova R, Baceviciene M, Tamosiunas A, Pajak A, Topor-Madry R, Stepaniak U, Malyutina S, Baldassarre D, Sennblad B, Tremoli E, de Faire U, Veglia F, Ford I, Jukema JW, Westendorp RG, de Borst GJ, de Jong PA, Algra A, Spiering W, Maitland-van der Zee AH, Klungel OH, de Boer A, Doevendans PA, Eaton CB, Robinson JG, Duggan D, Kjekshus J, Downs JR, Gotto AM, Keech AC, Marchioli R, Tognoni G, Sever PS, Poulter NR, Waters DD, Pedersen TR, Amarencu P, Nakamura H, McMurray JJ, Lewsey JD, Chasman DI, Ridker PM, Maggioni AP, Tavazzi L, Ray KK, Seshasai SR, Manson JE, Price JF, Whincup PH, Morris RW, Lawlor DA, Smith GD, Ben-Shlomo Y, Schreiner PJ, Fornage M, Siscovick DS, Cushman M, Kumari M, Wareham NJ, Verschuren WM, Redline S, Patel SR, Whittaker JC, Hamsten A, Delaney JA, Dale C, Gaunt TR, Wong A, Kuh D, Hardy R, Kathiresan S, Castillo BA, van der Harst P, Brunner EJ, Tybjaerg-Hansen A, Marmot MG, Krauss RM, Tsai M, Coresh J, Hoogeveen RC, Psaty BM, Lange LA, Hakonarson H, Dudbridge F, Humphries SE, Talmud PJ, Kivimaki M, Timpson NJ, Langenberg C, Asselbergs FW, Voevodova M, Bobak M, Pikhart H, Wilson JG, Reiner AP, Keating BJ, Hingorani AD y Sattar N (2015) HMG-coenzyme A reductase inhibition, type 2 diabetes, and bodyweight: evidence from genetic analysis and randomised trials. *Lancet* 385:351-361.

Szekely A, Levin J, Miao Y, Tudor IC, Vuylsteke A, Ofner P y Mangano DT (2011) Impact of hyperglycemia on perioperative mortality after coronary artery bypass graft surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 142:430-437 e431.

Taskinen MR y Boren J (2015) New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 239:483-495.

Theiss HD, Vallaster M, Rischpler C, Krieg L, Zaruba MM, Brunner S, Vanchev Y, Fischer R, Grobner M, Huber B, Wollenweber T, Assmann G, Mueller-Hoecker J, Hacker M y Franz WM (2011) Dual stem cell therapy after myocardial infarction acts specifically by enhanced homing via the SDF-1/CXCR4 axis. *Stem Cell Res* 7:244-255.

Tong G, Wang N, Zhou Y, Leng J, Gao W, Tong X, Shen Y, Yang J, Ye X, Zhou L y Gao Y (2014) Role of stromal cell-derived factor-1 in patients with non-ST elevation acute coronary syndrome. *Int Heart J* 55:219-227.

Tremblay AJ, Lamarche B, Deacon CF, Weisnagel SJ y Couture P (2014) Effects of sitagliptin therapy on markers of low-grade inflammation and cell adhesion molecules in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 63:1141-1148.

Tse HF, Thambar S, Kwong YL, Rowlings P, Bellamy G, McCrohon J, Thomas P, Bastian B, Chan JK, Lo G, Ho CL, Chan WS, Kwong RY, Parker A, Hauser TH, Chan J, Fong DY y Lau CP (2007) Prospective randomized trial of direct endomyocardial implantation of bone marrow cells for treatment of severe coronary artery diseases (PROTECT-CAD trial). *Eur Heart J* 28:2998-3005.

Urbich C y Dimmeler S (2004) Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 95:343-353.

van Ramshorst J, Bax JJ, Beeres SL, Dibbets-Schneider P, Roes SD, Stokkel MP, de Roos A, Fibbe WE, Zwaginga JJ, Boersma E, Schalij MJ y Atsma DE (2009) Intramyocardial bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia: a randomized controlled trial. *JAMA* 301:1997-2004.

Vazquez LA, Rodriguez A, Salvador J, Ascaso JF, Petto H y Reviriego J (2014) Relationships between obesity, glycemic control, and cardiovascular risk factors: a pooled analysis of cross-sectional data from Spanish patients with type 2 diabetes in the preinsulin stage. *BMC Cardiovasc Disord* 14:153.

Verma S, Farkouh ME, Yanagawa B, Fitchett DH, Ahsan MR, Ruel M, Sud S, Gupta M, Singh S, Gupta N, Cheema AN, Leiter LA, Fedak PW, Teoh H, Latter DA, Fuster V y Friedrich JO (2013) Comparison of coronary artery bypass surgery and percutaneous coronary intervention in patients with diabetes: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet Diabetes Endocrinol* 1:317-328.

von Hundelshausen P y Schmitt MM (2014) Platelets and their chemokines in atherosclerosis-clinical applications. *Front Physiol* 5:294.

Wang TJ, Gona P, Larson MG, Tofler GH, Levy D, Newton-Cheh C, Jacques PF, Rifai N, Selhub J, Robins SJ, Benjamin EJ, D'Agostino RB y Vasan RS (2006) Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 355:2631-2639.

Wang Y y Luther K (2012) Genetically manipulated progenitor/stem cells restore function to the infarcted heart via the SDF-1alpha/CXCR4 signaling pathway. *Prog Mol Biol Transl Sci* 111:265-284.

Weber C, Doring Y y Noels H (2015) Potential cell-specific functions of CXCR4 in atherosclerosis. *Hamostaseologie* 35.

Wei G, Srinivasan R, Cantemir-Stone CZ, Sharma SM, Santhanam R, Weinstein M, Muthusamy N, Man AK, Oshima RG, Leone G y Ostrowski MC (2009) Ets1 and Ets2 are required for endothelial cell survival during embryonic angiogenesis. *Blood* 114:1123-1130.

Wei Y, Nazari-Jahantigh M, Neth P, Weber C y Schober A (2013) MicroRNA-126, -145, and -155: a therapeutic triad in atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33:449-454.

Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M y Nickenig G (2005) Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353:999-1007.

Ye H, He F, Fei X, Lou Y, Wang S, Yang R, Hu Y y Chen X (2014) High-dose atorvastatin reloading before percutaneous coronary intervention increased circulating endothelial progenitor cells and reduced inflammatory cytokine expression during the perioperative period. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 19:290-295.

Yin Y, Zhao X, Fang Y, Yu S, Zhao J, Song M y Huang L (2010) SDF-1alpha involved in mobilization and recruitment of endothelial progenitor cells after arterial injury in mice. *Cardiovasc Pathol* 19:218-227.

Yiu KH y Tse HF (2014) Specific role of impaired glucose metabolism and diabetes mellitus in endothelial progenitor cell characteristics and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:1136-1143.

Zampetaki A, Kirton JP y Xu Q (2008) Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* 78:413-421.

Zernecke A, Schober A, Bot I, von Hundelshausen P, Liehn EA, Mopps B, Mericskay M, Gierschik P, Biessen EA y Weber C (2005) SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res* 96:784-791.

Zernecke A y Weber C (2010) Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 86:192-201.

Zhang J, Zhang X, Li H, Cui X, Guan X, Tang K, Jin C y Cheng M (2012) Hyperglycaemia exerts deleterious effects on late endothelial progenitor cell secretion actions. *Diab Vasc Dis Res* 10:49-56.

Zhang L y Xu Q (2014) Stem/Progenitor cells in vascular regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:1114-1119.

Zhao H, Wei R, Wang L, Tian Q, Tao M, Ke J, Liu Y, Hou W, Zhang L, Yang J y Hong T (2014) Activation of glucagon-like peptide-1 receptor inhibits growth and promotes apoptosis of human pancreatic cancer cells in a cAMP-dependent manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306:E1431-1441.

Zhao Y, Glesne D y Huberman E (2003) A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2426-2431.

Zhong J, Maiseyeu A, Davis SN y Rajagopalan S (2015) DPP4 in Cardiometabolic Disease: Recent Insights From the Laboratory and Clinical Trials of DPP4 Inhibition. *Circ Res* 116:1491-1504.

Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Muller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED y Peschle C (1999) KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 285:1553-1558.

Zimmet PZ, Magliano DJ, Herman WH y Shaw JE (2014) Diabetes: a 21st century challenge. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2:56-64.